



Patentdirektoratet  
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 5133/85 (51) Int.Cl.6 C 07 K 7/06  
(22) Indleveringsdag: 07 nov 1985  
(41) Alm. tilgængelig: 10 maj 1986  
(45) Patentets meddelelse bkg. den: 26 aug 1996  
(86) International ansøgning nr.: -  
(30) Prioritet: 09 nov 1984 JP 236076/84

(73) Patenthaver: \*EISAI CO. LTD.; 6-10, Koishikawa 4 chome; Bunkyo-ku, Tokyo, JP  
(72) Opfinder: Hiroshi \*Yoshino; JP, Yutaka \*Tsuchiya; JP, Takeru \*Kaneko; JP, Takahiro \*Nakazawa; JP, Masuhiro \*Ikeda; US, Shin \*Araki; JP, Kiyomi \*Yamatsu; JP, Shinro \*Tachibana; JP, Yoshihiro \*Arakawa; JP

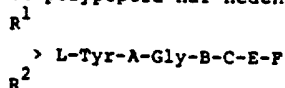
(74) Fuldmægtig: Internationalt Patent-Bureau

(54) Polypeptider, fremgangsmåder til deres fremstilling og analgetikum indeholdende et sådant polypeptid

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag: 5133-85

Hidtil ukendt polypeptid, der er nyttigt som analgetikum, hvilket polypeptid har nedenstående formel



hvor  $R^1$  og  $R^2$  kan være ens eller forskellige og hver især betegner et hydrogenatom eller en lavere alkylgruppe eller lavere alkenylgruppe, A betegner en D-aminosyre, Gly eller Sar dog således at D-aminosyren, såfremt den er D-Cys, er bundet med L-Cys eller D-Cys i stilling 5 gennem en S-S-binding til tilvejebringelse af intramolekuler ringslutning, B betegner L-Phe eller D-Phe, hvori benzenringen kan være substitueret, eller et  $\alpha$ -N-alkylderivat deraf, C betegner en L-aminosyre, D-Cys eller et

fortsættes

$\alpha$ -N-alkylderivat deraf, D og E betegner hver især en basisk L- eller D-aminosyre eller et  $\alpha$ -N-alkylderivat deraf, F betegner en gruppe med formlen:  $-\text{OR}^3$  (hvori  $\text{R}^3$  er H eller en lavere alkylgruppe),

en gruppe med formlen:  $-\text{N} \begin{matrix} \text{R}^4 \\ \text{R}^5 \end{matrix}$  (hvori  $\text{R}^4$  og  $\text{R}^5$

er ens eller forskellige og hver især betegner H eller en lavere alkylgruppe), en gruppe med formlen:  $-\text{G-OR}^6$  (hvori G er en  $\alpha$ -aminosyre,  $\beta$ -alanin,  $\gamma$ -aminosmørsyre eller et  $\alpha$ -N-alkylderivat deraf, og  $\text{R}^6$  betegner H eller en lavere alkylgruppe),

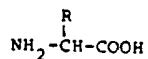
en gruppe med formlen:  $-\text{G-N} \begin{matrix} \text{R}^7 \\ \text{R}^8 \end{matrix}$  (hvori G har den

ovenfor angivne betydning, og  $\text{R}^7$  og  $\text{R}^8$  kan være ens eller forskellige og hver især betegner H eller en lavere alkylgruppe), en gruppe med formlen:  $-\text{G-L-Arg-OR}^9$  eller  $-\text{G-D-Arg-OR}^9$  (hvori D har den ovenfor angivne betydning, og  $\text{R}^9$  betegner H eller en lavere alkylgruppe eller en gruppe med formlen:

$-\text{G-L-Arg-N} \begin{matrix} \text{R}^{10} \\ \text{R}^{11} \end{matrix}$  eller  $-\text{G-D-Arg-N} \begin{matrix} \text{R}^{10} \\ \text{R}^{11} \end{matrix}$  (hvori G

har den ovenfor angivne betydning, og  $\text{R}^{10}$  og  $\text{R}^{11}$  kan være ens eller forskellig og hver især betegner H eller en lavere alkylgruppe), en gruppe med formlen:  $-\text{G-H-OR}^{12}$ , hvori G har den ovenfor angivne betydning, H er en neutral aminosyregruppe eller sur aminosyregruppe, og  $\text{R}^{12}$  er hydrogen eller en lavere alkylgruppe; eller en gruppe med formlen:  $-\text{G-Arg-I-OR}^{13}$ , hvor I er en D-aminosyregruppe og  $\text{R}^{13}$  er hydrogen eller en lavere alkylgruppe, dog således at ingen af de aminosyrer, der udgør polypeptidet med ovenstående formel, samtidig be-

tegner en L-aminosyre med den almene formel:



(hvori R betegner en gruppe, der svarer til strukturformlen for en aminosyre berøvet en gruppe med

formlen:  $-\text{CH}-\text{COOH}$ ),



eller farmakologisk acceptable salte deraf.

Den foreliggende opfindelse angår hidtil ukendte polypeptider, der har fremragende medicinske virkninger. Mere specielt angår opfindelsen polypeptider med den almene formel (I) (se krav 1), hvori symbolerne har den i 5 krav 1 anførte betydning, eller farmakologisk acceptable salte deraf. Endvidere angår opfindelsen en fremgangs- måde til fremstilling af disse polypeptider samt læge- midler, der indeholder dem.

De aminosyrer, der udgør de her omhandlede peptider, 10 omfatter D- og L-aminosyrer. Med mindre andet er angivet er aminosyrerne L-aminosyrer. De her anvendte symboler har samme betydning som i sædvanlig praksis inden for dette felt af peptidkemi. De har således følgende be- tydninger:

|    |           |                    |
|----|-----------|--------------------|
| 15 | Tyr:      | tyrosin            |
|    | Gly:      | glycin             |
|    | Sar:      | sarcosin           |
|    | Cys:      | cystein            |
| 20 | Phe:      | phenylalanin       |
|    | Arg:      | arginin            |
|    | Leu:      | leucin             |
| 25 | Ile:      | isoleucin          |
|    | Nle:      | norleucin          |
|    | Met:      | methionin          |
|    | Met(O):   | methioninesulfoxid |
| 30 | Ser:      | serin              |
|    | Val:      | valin              |
|    | homo-Arg: | homoarginin        |
|    | Orn:      | ornithin           |
| 35 | Glu:      | glutaminsyre       |
|    | Trp:      | tryptophan         |

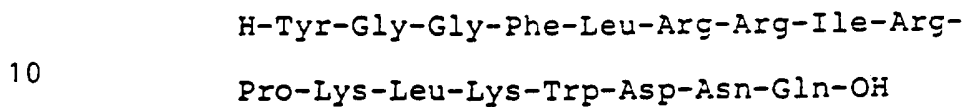
|    |                           |                              |
|----|---------------------------|------------------------------|
|    | Asp:                      | asparaginsyre                |
|    | Ala:                      | alanin                       |
|    | Pro:                      | prolin                       |
| 5  | Gln:                      | glutamin                     |
|    | Aib:                      | 2-aminoisomørsyre            |
|    | Phe(p-Cl):                | p-chlorphenylalanin          |
|    | Phe(p-Br):                | p-bromphenylalanin           |
| 10 | Phe(p-NO <sub>2</sub> ):  | p-nitrophenylalanin          |
|    | Phe(p-I):                 | p-iodphenylalanin            |
|    | Phe(p-F):                 | p-fluorphenylalanin          |
| 15 | Phe(p-CH <sub>3</sub> ):  | p-methylphenylalanin         |
|    | Phe(p-CH <sub>3</sub> O): | p-methoxyphenylalanin        |
|    | Phe(p-CF <sub>3</sub> ):  | p-trifluormethylphenylalanin |
|    | BOC:                      | tert-butoxycarbonyl          |
| 20 | Z:                        | benzyloxycarbonyl            |
|    | Cl <sub>2</sub> Bzl:      | 2,6-dichlorbenzyl            |
|    | CH <sub>3</sub> Bzl:      | 4-methylbenzyl               |
| 25 | Tos:                      | p-toluensulfonyl og          |
|    | Bzl:                      | benzyl                       |

### 30 Kent teknik

De iagttagelser der er gjort ved undersøgelser af mekanismen ved morphons analgetiske virkninger lader formode, at det levende legeme indeholder såkaldte endogene morfinlignende stoffer, der kontrollerer forskellige vitale følelser såsom smertefølelse og mental funktion. Efter en række studier blev enkephalin og endorphin isoleret som opioide peptider og deres

strukturer blev bestemt. Der blev derefter foretaget yderligere intensive undersøgelser på dette område, og der blev fundet adskillige hidtil ukendte opioide peptider såsom  $\beta$ -neoendorphin,  $\beta$ -casomorphin, kyotorphin, dermorphin og dynorphin.

Blandt disse er dynorphin et opioide peptid med følgende strukturformel, der er fundet af nogle af opfinderne af foreliggende opfindelse:



Dynorphin er et naturligt opioide peptid med specifikke virkninger på en K-receptor, og man forventer derfor anvendelse deraf som analgetikum uden bivirkninger såsom tolerance eller tilvænning.

#### Problemer der skal løses gennem opfindelsen

Dynorphin har imidlertid den mangel, at det ikke kan udøve en analgetisk virkning som sådant ved intravenøs injektion, idet det er ustabil i blodet.

Desuden ønskes et yderst aktivt peptid med en kortere kæde, idet dynorphin er et peptid med en forholdsvis lang kæde.

#### 25 Beskrivelse af opfindelsen

Opfinderne har foretaget intensive undersøgelser af peptider med en kæde, der er kortere end dynorphinets, og som er i stand til at udøve deres analgetiske virkning ved såvel intravenøs som subkutan injektion, og de har til slut fundet, at dette formål kan opnås ved anvendelse af hidtil ukendte peptider med den almene formel I, eller farmakologisk acceptable salte deraf.

35           Eksempler på farmakologisk acceptable salte omfatter salte af uorganiske syrer såsom hydrochlorid, sulfat, hydrobromid og hydroiodid såvel som salte af organiske syrer såsom maleat, fumarat, succinat, acetat, malonat, citrat og benzoat.

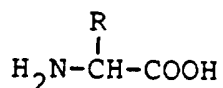
Et formål for foreliggende opfindelse er følgende at tilvejebringe hidtil ukendte peptider, der er nyttige som lægemidler, især som analgetika.

Et andet formål for opfindelsen er at tilvejebringe en fremgangsmåde til fremstilling af hidtil ukendte peptider, der er nyttige som lægemidler.

Et yderligere formål for opfindelsen er at tilvejebringe nye analgetika, der indeholder nævnte peptider.

Udtrykket "lavere alkyl" i definitionerne i krav 1 er benyttet til betegnelse af ligekædede, forgrenede, cycliske og ringholdige alkylgrupper med 1 til 6 carbonatomer såsom methyl-, ethyl-, n-propyl-, isopropyl-, n-butyl-, iso-butyl-, 1-methylpropyl-, tert-butyl-, cyclopropylmethyl-, n-pentyl-, 1-ethylpropyl-, isoamyl- og n-hexylgrupper.

Strukturen af forbindelsen I ifølge foreliggende opfindelse er karakteristisk ved, at polypeptider, hvori alle de aminosyrer, der udgør peptidet, er L-aminosyrer med den almene formel:



(hvori R betegner en gruppe svarende til en strukturformel for en aminosyre berøvet en gruppe med formlen:

-CH-COOH) er udelukket derfra, dvs. at mindst én af

$$\begin{array}{c} | \\ \text{NH}_2 \end{array}$$

de indgående aminosyrer er en  $\alpha$ -N-alkylaminosyre eller D-aminosyre.

Forbindelserne ifølge den foreliggende opfindelse, hvori mindst én af de indgående aminosyrer er en  $\alpha$ -N-alkylaminosyre eller D-aminosyre, er fri for de alvorlige mangler hos det ovennævnte dynorphin og dets derivater, at de ikke kan udøve en analgetisk virkning som sådanne ved intravenøs injektion, idet de er ustabile i blodet. Da forbindelserne ifølge opfindelsen har en særdeles høj stabilitet in vivo og i praksis er anvendelige som analgetika er de således yderst værdifulde.

For at lette forståelsen af den foreliggende opfindelse vil der nedenfor blive givet eksempler på typiske forbindelser ifølge opfindelsen:

- 5
- $\text{CH}_3\text{Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-NH}_2$
  - $\text{Tyr-D-Met-Gly-Phe(p-Cl)-Leu-Orn-D-Arg-D}$   
 $\text{-Ala-NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$
  - $\text{CH}_3\text{Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-CH}_3\text{Arg-D-Leu-}$   
 10  $\text{Arg-NHCH}_2\text{CH}_3$
  - $\text{CH}_3\text{Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Tyr-Arg-Arg-D-Leu-}$   
 $\text{NE}_2$
  - 15 ◦  $\begin{matrix} \text{CH}_3 \\ > \\ \text{CH}_3 \end{matrix} \text{Tyr-Gly-Gly-Phe(p-CH}_3\text{)-Met-Arg-Lys-}$   
 $\text{Asp-Arg-NECH}_2\text{CH}_3$
  - $\text{Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-D-Leu-NE}_2$
  - 20 ◦  $\text{CH}_3\text{Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-D-Glu-Arg-}$   
 $\text{NE}_2$
  - $\text{CH}_3\text{Tyr-Gly-Gly-Phe-Met(O)-Arg-CH}_3\text{Arg-D-Leu-}$   
 25  $\text{Arg-NE}_2$
  - $\text{Tyr-D-Cys-Gly-Phe-D-Cys-Arg-CH}_3\text{Arg-D-Leu-}$   
 $\text{NHCH}_2\text{CH}_3$
  - 30 ◦  $\text{Tyr-Sar-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-D-Leu-NE}_2$
  - $\triangleleft\text{-CH}_2\text{Tyr-Gly-Gly-Phe(p-CH}_3\text{O)-Ile-Arg-}$
  - 35  $\text{CH}_3\text{Lys-D-Met-N} \begin{matrix} < \\ \text{CH}_3 \\ < \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$

- $\text{CH}_3\text{Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-D-Leu-NE}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$
- 5 ◦  $\text{CH}_3\text{Tyr-Gly-Gly-Phe-tert-Leu-Arg-CH}_3\text{Arg-D-Leu-NECH}_2\text{CH}_3$
- $\text{Tyr-D-Tyr-Gly-Phe-Glu-D-Arg-Arg-Asp-NH}_2$
- 10 ◦  $\text{CH}_3\text{Tyr-Gly-Gly-Phe-CH}_3\text{Leu-Arg-Arg-D-Leu-NH}_2$
- $\text{Tyr-D-Ser-Gly-Phe-Ser-Arg-CH}_3\text{Arg-D-Leu-NECH}_2\text{CH}_3$
- 15 ◦  $\text{CH}_3\text{Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-D-Leu-Arg-NH}_2$
- 20 ◦  $\text{CH}_3\text{Tyr-Gly-Gly-D-Phe-Leu-Arg-Arg-D-Leu-NH}_2$
- $\text{CH}_3\text{Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-D-Leu-OH}$
- 25 ◦  $\text{CH}_3\text{Tyr-Gly-Gly-Phe(p-NO}_2\text{)-Leu-Arg-CH}_3\text{Arg-D-Leu-Arg-NECH}_2\text{CH}_3$
- $\text{Tyr-D-Cys-Gly-Phe-Cys-Arg-CH}_3\text{Arg-D-Leu-NECH}_2\text{CH}_3$
- 30 ◦  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-D-Phe-Arg-NH}_2$
- 35 ◦  $\text{CH}_3\text{Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-CH}_3\text{Arg-D-Ala-OH}$



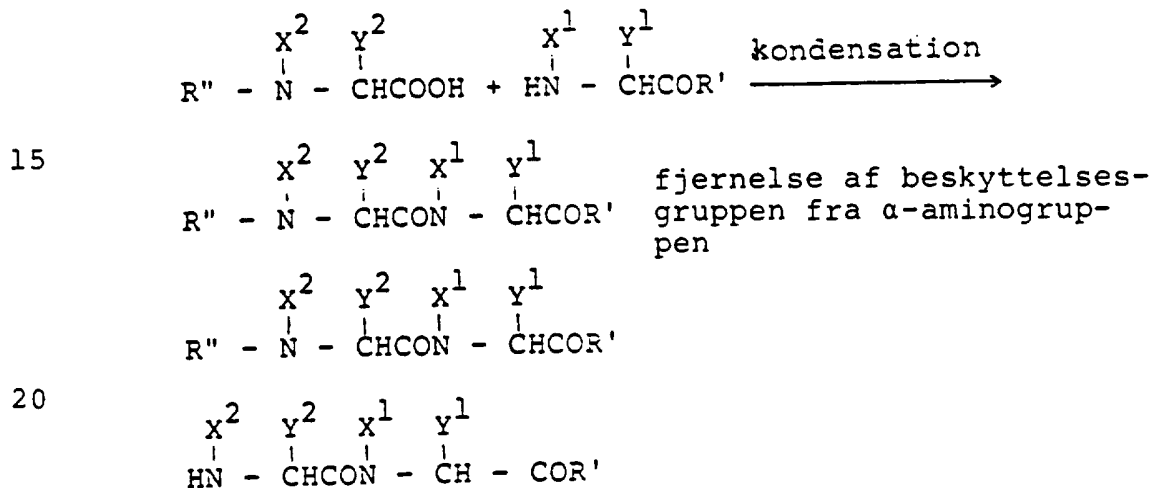
- Tyr-D-Cys-Gly-Phe-Cys-Arg-D-Arg-Lys-D-Arg-NH<sub>2</sub>
- 5 ◦ CH<sub>3</sub>Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-CH<sub>3</sub>Arg-OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>
- CH<sub>3</sub>Tyr-D-Ala-Gly-CH<sub>3</sub>Phe-Met(O)-Arg-CH<sub>3</sub>Arg-Ile-NH<sub>2</sub>
- 10 ◦ CH<sub>3</sub>Tyr-Gly-Gly-CH<sub>3</sub>Phe-Leu-Arg-Arg-D-Leu-NH<sub>2</sub>
- Tyr-D-Ala-Gly-Phe-CH<sub>3</sub>Met-Arg-Arg-Leu-Arg-NECH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>
- 15 ◦ D-Gln-Arg-NH<sub>2</sub>
- CH<sub>3</sub>Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-CH<sub>3</sub>Arg-D-Leu-OH
- 20 ◦ CH<sub>3</sub>Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Lys-CH<sub>3</sub>Lys-Met-NH<sub>2</sub>
- CH<sub>3</sub>Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-NECH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>
- 25 ◦ CH<sub>3</sub>Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Lys-CH<sub>3</sub>Arg-CH<sub>3</sub>Ile-OH
- CH<sub>3</sub>Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-CH<sub>3</sub>Arg-D-Ala-OH
- 30 ◦ CH<sub>3</sub>Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-CH<sub>3</sub>Arg-CH<sub>3</sub>Ala-OH
- CH<sub>3</sub>Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-CH<sub>3</sub>Arg-Ile-OH
- CH<sub>3</sub>Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-CH<sub>3</sub>Arg-Asp-OH
- CH<sub>3</sub>Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-CH<sub>3</sub>Arg-CH<sub>3</sub>Ile-OH
- 35 ◦ CH<sub>3</sub>Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-CH<sub>3</sub>Arg-Sar-OH
- CH<sub>3</sub>Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-CH<sub>3</sub>Arg-β-Ala-OH

Peptiderne ifølge den foreliggende opfindelse kan syntetiseres ved en vilkårlig passende fremgangsmåde. De beskyttede peptider kan syntetiseres ved  
5 hjælp af en almindelig flydende-fase-proces eller fast-fase-proces. Det foretrækkes sædvanligvis, at en funktionel gruppe i en sidekæde i aminosyrer beskyttes. Alle beskyttelsesgrupperne fjernes i sluttrinnet. Beskyttelsesgrupperne for de funktionelle  
10 grupper i sidekæderne i aminosyrerne omfatter alle de beskyttelsesgrupper, der hidtil er blevet rapporteret. Typiske eksempler på disse grupper omfatter tosyl (Tos)-, nitro (NO<sub>2</sub>)-, benzyl (Bzl)-, tert-butyl (But)-, benzoyloxycarbonyl (Z)- og tert-butoxycarbonyl  
15 (BOC)-grupper.

Som beskyttelsesgrupper for  $\alpha$ -aminogrupperne i aminosyrerne kan benyttes alle de beskyttelsesgrupper, der hidtil er blevet rapporteret. Det foretrækkes imidlertid at udvælge kombinationen af beskyttelsesgrupperne på en sådan måde, at kun beskyttelsesgrupperne for  
20  $\alpha$ -aminogrupperne kan fjernes selektivt uden at beskyttelsesgrupperne for de funktionelle grupper i sidekæderne påvirkes. Når der f.eks. benyttes en tert-butoxycarbonylgruppe som beskyttelsesgruppe for  $\alpha$ -aminogruppen foretrækkes f.eks. en benzyl- eller benzyloxycarbonylgruppe til beskyttelse af den funktionelle  
25 gruppe i sidekæden. Når der benyttes en benzyloxycarbonylgruppe til beskyttelse af  $\alpha$ -aminogruppen foretrækkes en tert-butyl- eller tert-butoxycarbonylgruppe til beskyttelse af den funktionelle gruppe i sidekæden.  
30 Når aminogruppen i Tyr ved N-terminalen er dialkyleret, kan man lade aminogruppen være som den er uden yderligere beskyttelse. For at forhindre racemisering syntetiseres det beskyttede peptid fortrinsvis ved  
35

hjælp af en trinvis proces, hvori alle aminosyrerne  
 successivt forbindes, idet man starter fra C-terminalen,  
 eller ved en proces, hvori fragmentkondensationen udfø-  
 res ved Gly's stilling. Det er også muligt at udføre  
 5 fragmentkondensationen i en vilkårlig ønsket stilling.

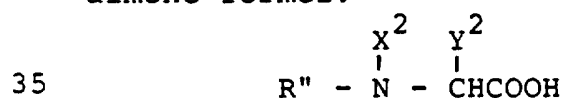
Ved såvel fast-fase-processen som flydende-fase-  
 processen ifølge den foreliggende opfindelse fjernes  
 beskyttelsesgrupperne fra peptidet, og dette renses  
 ved at gentage reaktionerne i nedenstående skema for  
 10 syntese af peptidet. Trinnene i denne proces illustreres  
 med henvisning til flydende-fase-processen:



hvori  $X^1$  og  $X^2$  hver især betegner H eller en alkyl-  
 25 gruppe,  $Y^1$  og  $Y^2$  betegner en aminosyresidekæde, og  
 $R'$  og  $R''$  betegner en beskyttelsesgruppe eller en  
 peptidrest.

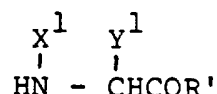
(1) Reaktion til dannelse af en peptidbinding:

Peptidbindingen kan dannes under anvendelse af en  
 30 vilkårlig af de hidtil rapporterede fremgangsmåder.  
 En almindelig anvendt fremgangsmåde omfatter aktive-  
 ring af carboxylgruppen i en syrekomponent med den  
 almene formel:



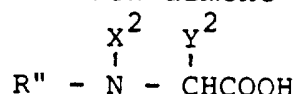
ved en i og for sig kendt metode såsom azidmetoden,  
 dicyclohexylcarbodiimid (DCC)-metoden, blandet anhy-  
 drid-metoden eller aktiv ester-metoden og omsætning af

den aktiverede forbindelse med en aminkomponent med den almene formel:



5 Reaktionsbetingelserne såsom opløsningsmiddel og temperatur ved reaktionen kan variere alt efter fremgangs- måden til aktivering af carboxylgruppen. Blandet an- hydrid-metoden, der er én af typiske kondensations- metoder, udføres på følgende måde:

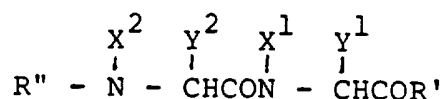
10 en syrekomponent med den almene formel:



opløses i et aprotisk opløsningsmiddel såsom dimethyl- formamid, tetrahydrofuran eller ethylacetat, den resul- terende opløsning afkøles til ca.  $-20^{\circ}\text{C}$ , og der til- sættes derpå successivt ækvimolære mængder N-methyl- morpholin og ethylchlorcarbonat til opløsningen. Efter 15 5 minutters forløb tilsættes en aminkomponent med den almene formel:



i ækvimolær mængde, og blandingen omrøres ved  $-15$  til  $0^{\circ}\text{C}$  i 2 til 5 timer og behandles derpå på sædvanlig måde til opnåelse af et beskyttet peptid med den almene 25 formel:



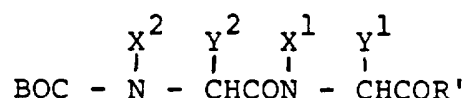
(2) Fjernelse af en beskyttelsesgruppe fra en  $\alpha$ -amino- 30 gruppe:

Fjernelsen af en beskyttelsesgruppe udføres ved hjælp af en i og for sig kendt fremgangsmåde såsom en katalytisk reduktionsmetode, en metode hvorved der benyttes en syre, en metode hvorved der benyttes en 35 base og en metode, hvorved der benyttes hydrazin. En foretrukket fremgangsmåde udvælges blandt disse fremgangsmåder alt efter arten af beskyttelsesgruppen for  $\alpha$ -aminogruppen. Typiske metoder omfatter en metode,

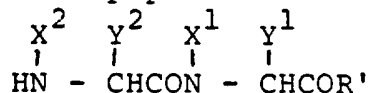
hvorved beskyttelsesgruppen fjernes ved katalytisk reduktion af benzyloxycarbonylgruppen, og en metode hvorved tert-butoxycarbonylgruppen fjernes med trifluoreddikesyre.

5 Nedenfor vil en udførelsesmåde for fremgangsmåden til fjernelse af tert-butoxycarbonylgruppen med trifluoreddikesyre blive beskrevet i enkeltheder:

0,25 ml anisol og 5 ml trifluoreddikesyre sættes til 1 g af et  $\alpha$ -N-butoxycarbonylpeptid med den almene  
10 formel:



under afkøling med is. Blandingen omrøres i 60 minutter og behandles derpå med ether til opnåelse af et tri-  
15 fluoracetat af et peptid med den almene formel:



Dette produkt opløses i et opløsningsmiddel og neutraliseres med en amin såsom triethylamin til opnåelse  
20 af en forbindelse, der underkastes den efterfølgende reaktion.

(3) Fjernelse af samtlige beskyttelsesgrupper:

Efter gentagelse af den ovenfor nævnte kondensation og fjernelse af beskyttelsesgrupperne for  $\alpha$ -aminogru-  
25 pper for forlængelse af peptidkæden fjernes samtlige beskyttelsesgrupper til opnåelse af det ønskede rå peptid. Beskyttelsesgrupperne fjernes på i og for sig kendt måde, f.eks. ved katalytisk reduktion,  
30 en fremgangsmåde hvorved der benyttes flydende ammoniak/alkalimetal, en fremgangsmåde hvorved benyttes en syre, en fremgangsmåde hvorved benyttes en base eller en fremgangsmåde, hvorved der benyttes hydrazin. I praksis vælges fremgangsmåden alt efter arten af beskyttelses-  
35 sesgruppen. Een af hyppigt anvendte fremgangsmåder består i fjernelse af beskyttelsesgruppen med hydrogenfluorid (HF) på følgende måde:

1 g af et beskyttet peptid opløses i ca. 30 ml HF i nærværelse af 0,5 ml anisol ved -15 til 0°C i en lukket HF reaktionsbeholder. Opløsningen omrøres i 60 minutter og HF afdestilleres fra reaktionssystemet.

5 Remanensen vaskes med ether og opløses i vand. Opløsningen behandles med Amberlite IRA-93 (eddikesyretype) og frysetørres til opnåelse af et rå peptid, hvorfra beskyttelsesgrupperne er blevet fjernet.

10 (4) Rensning af rå peptid:

Det rå peptid kan renses på i og for sig kendt måde såsom ved ionbytningsschromatografi, gelfiltrering, fordelingschromatografi, modstrømsfordeling og HPLC (high performance liquid chromatography). Rensningen kan f.eks. udføres ved følgende HPLC: 100 mg af

15 det rå peptid påføres en søjle med en diameter på 20 mm og en højde på 250 mm, hvilken søjle indeholder Nucleosil 5 c 18 som bærer og elueres med 0,05% HCl (H<sub>2</sub>O-CH<sub>3</sub>CN). Fraktioner med toppe, der svarer til

20 det ønskede peptid, blev opsamlet ved påvisning ved UV 210 nm og frysetørret til opnåelse af det ønskede peptid.

Når peptidet indeholder 2 Cys- eller D-Cys-enheder i molekylet oxideres det rå peptid ved en i og

25 for sig kendt oxidationsproces med luft eller hydrogenperoxid før rensningen, hvorved der opnås et ringsluttet produkt af høj renhed.

Resultaterne af nedenstående dyreforsøg vil

30 yderligere illustrere virkningerne af forbindelserne ifølge den foreliggende opfindelse benyttet som lægemidler.

Forsøg 1

35 Analgetiske prøver

En prøveforbindelse blev opløst i fysiologisk saltopløsning. Hanmus af ddY-stammen (20-27 g legemsvægt, sædvanligvis studeret i grupper på 8) blev be-

handlet intravenøst eller subkutant. Analgetiske virkninger blev målt ved hjælp af haleknibningsprøven.

Ved haleknibningsprøven 1) blev en klemme, der udøvede et tryk på 300 g, anbragt ved haleroden inklusive  
5 anal mycosa, og latenstiden for bidning efter klemmen blev målt. Dyrene blev screenet for haleklemmenociception før forsøgene, og de mus, der ikke bed i løbet af 3 sekunder, blev fjernet fra forsøgene. En latenstid på mere 6 sekunder blev benyttet som kriterium for  
10 analgi.

ED<sub>50</sub>-Værdierne (50% analgetisk effektiv dosis) blev beregnet ved Litchfield og Wilcoxon's metode 2). Resultaterne er vist i tabellerne 1 og 2. Tabel 1 viser de resultater, der er opnået ved intravenøs injektion. Tabel 2 viser de resultater, der er opnået ved  
15 subkutan injektion.

Numrene i prøveforbindelsekolonnen i tabellerne 1 og 2 svarer til numrene på slutforbindelserne fremstillet ifølge nedenstående eksempler.

Tabel 1

| Prøveforbindelse<br>(Eksempel nr) | Haleknibningsmetode (i.v.)<br>ED <sub>50</sub> (mg/kg) |
|-----------------------------------|--|
| 1                                 | 0,75   |
| 2                                 | 0,24   |
| 5                                 | 3,4  |
| 6                                 | 4,3  |
| 7                                 | 3,9  |
| 8                                 | 3,3  |
| 10                                | 1,2  |
| 18                                | 4,5  |
| 19                                | 2,0  |
| 21                                | 0,8  |
| 22                                | 3,0  |
| 24                                | 0,22   |
| 25                                | 1,8  |
| 27                                | 0,7  |
| 28                                | 0,7  |
| 29                                | 2,0  |
| dynorphin (1-13)                  | >25,0  |

Tabel 2

| Prøveforbindelse<br>(Eksempel nr.) | Haleknibningsmetode (s.c.)<br>ED <sub>50</sub> (mg/kg) |
|------------------------------------|--|
| 1                                  | 1,0  |
| 2                                  | 0,44   |
| 21                                 | 0,8  |
| 24                                 | 0,32   |
| 27                                 | 0,8  |
| 28                                 | 1,5  |



- (Note 1) Haleknibningsmetoden blev udført ifølge Tagaki, H., et al. "Jap. J. Pharmacol." Vol. 16, 287-294 (1966).
- (Note 2) Lichtfield-Wilcoxon metoden blev udført ifølge  
5 Lichtfield, J. T., og F. Wilcoxon, "J. Pharmacol. Exp. Ther." Vol. 96, 99-113 (1949).

## Forsøg 2

### Opioid virkning

10 Forbindelsernes opioide virkninger blev undersøgt ved den metode, hvorved der benyttes kanin vas deferens ifølge T. Oka, K Negishi, M. Suda, T. Matsumiya, T. Inaza og M. Ueki, "Europ. J. Pharmacol." Vol. 73, 235 (1980).

15 Ved denne prøve blev voksne hankaniner dræbt ved indføring af luft i en otisk åre. Umiddelbart efter døden blev udført en laparotomi og højre og venstre vasa deferens blev fjernet. Sæden blev presset ud af kanalerne og ud i Ringer's opløsning. En del  
20 af hver kanal blev afskåret (2,5 cm lang, fra en ende fra prostata-siden). Stykkerne fra de deferentiale kanaler blev ved hjælp af en tråd ophængt i en 6 ml glascelle med konstant temperatur og blev stimuleret elektrisk med et apparat til elektrisk stimulering  
25 med platinelektroder under betingelserne 0,1 Hz, 1 ms og 90 volt. En kontraktion, der skyldtes den elektriske stimulering, blev optegnet ved hjælp af en transducer.

Den opioide virkning blev bestemt på basis af hæmningen af kontraktionen, der skyldtes den elek-  
30 triske stimulering.

Resultaterne er vist i tabel 3 udtrykt som 50% hæmningskoncentration ( $IC_{50}$ ).

Tabel 3

|    | Prøveforbindelse<br>(Eksempel nr.) | Kanin vas deferens -metode |
|----|------------------------------------|----------------------------|
| 5  | 1                                  | 3,5                        |
|    | 2                                  | 0,04                       |
|    | 3                                  | 6,03                       |
|    | 6                                  | 4,5                        |
| 10 | 8                                  | 6,2                        |
|    | 19                                 | 2,8                        |
|    | 24                                 | 0,08                       |
|    | 25                                 | 0,58                       |
| 15 | 27                                 | 2,0                        |
|    | 28                                 | 6,5                        |
|    | dynorphin A (1-17)                 | 17,4                       |

20 Det fremgår af tabel 3, at forbindelserne ifølge den foreliggende opfindelse har en meget stærk virkning sammenlignet med dynorphin A.

De har endvidere stærke virkninger hvad angår hæmning af kontraktionen af ileumlængdemuskler hos 25 marsvin og deferentiale kanaler hos mus som følge af elektrisk stimulering.

Det fremgår af ovenstående farmakologiske forsøgsresultater, at peptidforbindelserne ifølge den foreliggende opfindelse har opioide virkninger svarende 30 til virkningerne af dynorphin, og at deres virkninger er særdeles stærke og endvidere, at de bemærkelsesværdige analgetiske virkninger udøves såvel ved intravenøs som ved subkutan injektion.

Det er overordentlig værdifuldt, at forbindelserne ifølge den foreliggende opfindelse udøver de 35 stærke analgetiske virkninger ved systemisk administrering ved intravenøs eller subkutan injektion, medens dynorphin og dets derivater efter hvad der hidtil er rapporte-

ret næppe udøver deres analgetiske virkninger ved intravenøs injektion, idet de er ustabile i blodet.

Forholdet mellem toxiciteten (mindste letale dosis) af peptidet, der er fremstillet ifølge eksemplerne 1 og 2 nedenfor, og den effektive dosis er vist i tabel 4.

Tabel 4

Effektiv dosis og mindste letale dosis ved subkutan indgift i mus.

| Forbindelse<br>(Eksempel nr.) | Haleknibning<br>ED <sub>50</sub><br>(mg/kg) | Mindste letale<br>dosis (mg/kg) |
|-------------------------------|---|---------------------------------|
| Eksempel 1                    | 1,0   | 100                             |
| Eksempel 2                    | 0,44  | 20                              |

Peptidforbindelserne ifølge den foreliggende opfindelse har bemærkelsesværdige analgetiske virkninger, og de er nyttige som lægemidler indenfor det terapeutiske område.

Ved anvendelse af forbindelserne som analgetika indgives de peroralt eller parenteralt. Sædvanligvis indgives de parenteralt i form af intravenøs, subkutan eller intramuskulær injektion eller som suppositorier eller sublinguale tabletter. Dosis varierer alt efter symptomerne, patientens alder, køn, legemsvægt, følsomhed, administreringsmåde, sygdommens trin, intervaller, lægemiddelpræparatets egenskaber, formulering, præparatets art og arten af den aktive bestanddel. Selvom doseringen således ikke ligger indenfor specielle grænser, andrager den sædvanligvis ca. 0,1 til 1000 mg, fortrinsvis ca. 1 til 300 mg/dag for voksne.

Forbindelserne ifølge den foreliggende opfindelse kan formuleres til injektionspræparater, suppositorier, sublinguale tabletter, tabletter og kapsler ved en indenfor dette tekniske område almindelig fremgangsmåde.

Ved fremstillingen af injektionspræparaterne sættes additiver såsom pH-kontrollerende midler, puffermidler, suspenderingsmidler, opløseliggørende midler, stabilisatorer, isotoniserende midler og konserveringsmidler til den aktive bestanddel, og den opnåede  
5 blanding formuleres til et intravenøst, subkutant eller intramuskulært injektionspræparat på vilkårlig kendt måde. Om nødvendigt kan blandingen lyofiliseres ved konventionelle metoder.

10 Eksempler på suspenderingsmidler er methylcellulose, Polysorbat 60, hydroxyethylcellulose, akacie, tragacanthpulver, natriumcarboxymethylcellulose og polyoxyethylensorbitanmonolaurat.

Eksempler på opløseliggørende midler er polyoxyethylen-hærdet ricinusolie, Polysorbat 80, nicotinamid,  
15 polyoxyethylensorbitanmonolaurat, macrogol og ethylestere af ricinusoliefedtsyrer.

Eksempler på stabilisatorer er natriumsulfit, natriummetasulfit og ethere. Eksempler på konserveringsmidler er methyl-p-hydroxybenzoat, ethyl-p-hydroxybenzoat, sorbinsyre, phenol, cresol og chlorcresol.  
20

Den foreliggende opfindelse vil blive nærmere illustreret ved hjælp af følgende typiske eksempler, der på ingen måde begrænser opfindelsen.

25

## Eksempel 1

1) Syntese af  $\text{CH}_3\text{Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-CH}_3\text{Arg-D-Leu-NHC}_2\text{H}_5$

25 g Boc-D-Leu-OH·H<sub>2</sub>O blev opløst i 200 ml THF.  
30 Opløsningen blev afkølet til -20°C. Der blev til opløsningen sat 11 ml N-methylmorpholin og 9,56 ml ethylchlorcarbonat. Efter 5 minutters forløb tilsattes 12,9 g af en 70%'s vandig ethylaminopløsning, og blandingen blev omrørt ved ca. -5°C i 2 timer. Efter koncentration blev remanensen opløst i ethylacetat og successivt  
35 vasket med en vandig NaHCO<sub>3</sub>-opløsning og vand. Efter koncentration til tørhed opnåedes 24,5 g Boc-D-Leu-NHC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>.

Smp.: 103-106°C

TLC: Rf-værdi 0,77 (ethylacetat)

Optisk drejning:  $[\alpha]_D = +20,0^\circ$  (C = 1, methanol)

Elementaranalyse for  $C_{13}H_{26}N_2O_3$ :

| 5            | C     | H     | H     |
|--------------|-------|-------|-------|
| beregnet (%) | 60,44 | 10,14 | 10,84 |
| fundet (%)   | 60,42 | 10,33 | 10,86 |

### 2) Syntese af Z-CH<sub>3</sub>Arg(Tos)-D-Leu-NHC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>

10 1,43 g Z-CH<sub>3</sub>Arg(Tos)-OH,  $[\alpha]_D = -15^\circ$  (C = 1, dimethylformamid), syntetiseret ud fra H-Arg(Tos)-OH ifølge den af P. Quitt et al. beskrevne metode [Helvetica Chimica Acta, 32, 327 (1963)], blev opløst i 15 ml tetrahydrofuran. Efter afkøling til -30°C sattes 0,33

15 ml N-methylmorpholin og 0,29 ml ethylchlorcarbonat til opløsningen. Efter 5 minutters forløb tilsattes en opløsning af 817 mg CF<sub>3</sub>COOH·H-D-Leu-NHC<sub>2</sub>H<sub>5</sub> (syntetiseret ved behandling af Boc-D-Leu-NHC<sub>2</sub>H<sub>5</sub> med CF<sub>3</sub>COOH i nærværelse af anisol) og 0,83 ml triethylamin i 7 ml

20 tetrahydrofuran, og blandingen blev omrørt ved ca. -5°C i 2 timer. Efter koncentreret blev remanensen opløst i ethylacetat, vasket med en vandig NaHCO<sub>3</sub>-opløsning og derpå med vand og koncentreret til tørhed, hvorved opnåedes 1,58 g glasagtig Z-CH<sub>3</sub>Arg(Tos)-D-Leu-NHC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>.

25 TLC: Rf-værdi 0,68 (methanol/chloroform, 1:7)

Optisk drejning:  $[\alpha]_D = 0 \pm 0,5^\circ$  (C = 1, methanol)

Elementaranalyse for  $C_{30}H_{44}N_6O_6S$ :

|                 | C     | H    | N     |
|-----------------|-------|------|-------|
| 25 beregnet (%) | 58,42 | 7,19 | 13,63 |
| 30 fundet (%)   | 58,29 | 7,19 | 13,40 |

### 3) Syntese af Boc-Arg(Tos)-CH<sub>3</sub>Arg(Tos)-D-Leu-NHC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>

35 1,1 g CH<sub>3</sub>Arg(Tos)-D-Leu-NHC<sub>2</sub>H<sub>5</sub> opnået ved katalytisk reduktion af Z-CH<sub>3</sub>Arg(Tos)-D-Leu-NHC<sub>2</sub>H<sub>5</sub> i nærværelse af Pd/C, 983 ml Boc-Arg(Tos)-OH og 372 mg N-hydroxybenzotriazol blev opløst i 4 ml dimethylformamid. Der blev til opløsningen sat 520 mg dicyclohexylcarbo-

diimid under afkøling med is, og blandingen blev omrørt i køleskab een dag og derpå ved stuetemperatur een dag. De således dannede bundfald blev frafiltreret, og filtratet blev koncentreret. Koncentrationsremanensen

5 blev rensset ved silicagelsøjlechromatografi (elueringsmiddel: MeOH/CHCl<sub>3</sub> = 1/15), hvorved opnåedes 1,2 g glasagtig Boc-Arg(Tos)-CH<sub>3</sub>Arg(Tos)-D-Leu-NHC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>.

TLC: Rf-værdi 0,64 (methanol/chloroform, 1:7)

Optisk drejning:  $[\alpha]_D = -20,6^\circ$  (C = 1, methanol)

10 Elementaranalyse for C<sub>40</sub>H<sub>64</sub>N<sub>10</sub>O<sub>9</sub>S<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O:

|              | C     | H    | N     |
|--------------|-------|------|-------|
| beregnet (%) | 52,72 | 7,30 | 15,37 |
| fundet (%)   | 52,82 | 7,22 | 15,06 |

15 4) Syntese af Boc-Leu-Arg(Tos)-CH<sub>3</sub>Arg(Tos)-D-Leu-NHC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>

1,645 g Boc-Leu-OH·H<sub>2</sub>O blev opløst i 12 ml dimethylformamid. Opløsningen blev afkølet til -20°C. Der sættes 0,726 ml N-methylmorpholin og 0,631 ml ethylchlorcarbonat til opløsningen. Efter 5 minutters

20 forløb tilsættes en opløsning af 4,986 g CF<sub>3</sub>COOH·HArg(Tos)-CH<sub>3</sub>Arg(Tos)-D-Leu-NHC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, syntetiseret ved behandling af Boc-Arg(Tos)-CH<sub>3</sub>Arg(Tos)-D-Leu-NHC<sub>2</sub>H<sub>5</sub> med CF<sub>3</sub>COOH i nærværelse af anisol, og 0,726 ml N-methylmorpholin i 12 ml dimethylformamid,

25 og blandingen blev omrørt ved ca. -5°C i 2 timer. Efter koncentreret blev remanensen opløst i ethylacetat, og opløsningen blev vasket med vandig NaHCO<sub>3</sub>-opløsning og derpå med vand. Efter koncentreret efterfulgt af størkning med methanol/ether opnåedes 5,283 g

30 Boc-Leu-Arg(Tos)-CH<sub>3</sub>Arg(Tos)-D-Leu-NHC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>.

Smp.: 120-125°C (dek.)

TLC: Rf-værdi 0,66 (methanol/chloroform, 1:7)

Optisk drejning:  $[\alpha]_D = -25,8^\circ$  (C = 1, methanol)

Elementaranalyse for C<sub>46</sub>H<sub>75</sub>N<sub>11</sub>O<sub>10</sub>S<sub>2</sub>·CH<sub>3</sub>OH:

35

|              | C     | H    | N     |
|--------------|-------|------|-------|
| beregnet (%) | 54,36 | 7,67 | 14,84 |
| fundet (%)   | 54,49 | 7,63 | 14,62 |

5) Syntese af Boc-Phe-Leu-Arg(Tos)-CH<sub>3</sub>Arg(Tos)-D-Leu-NHC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>

1,465 g Boc-Phe-OH blev opløst i 12 ml dimethylformamid. Opløsningen blev afkølet til -30°C. Der sattes  
 5 til opløsningen 0,608 ml N-methylmorpholin og 0,528 ml ethylchlorcarbonat. Efter 5 minutters forløb tilsattes en opløsning af 4,691 g CF<sub>3</sub>COOH·H-Phe-Leu-Arg(Tos)-CH<sub>3</sub>Arg(Tos)-D-Leu-NHC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, syntetiseret ved behandling af Boc-Phe-Leu-Arg(Tos)-CH<sub>3</sub>Arg(Tos)-D-Leu-NHC<sub>2</sub>H<sub>5</sub> med  
 10 CF<sub>3</sub>COOH i nærværelse af anisol, og 0,608 ml N-methylmorpholin i 12 ml dimethylformamid til opløsningen, og blandingen blev omrørt ved ca. -5°C i 2 timer. Efter koncentreret blev remanensen opløst i ethylacetat, og opløsningen blev vasket med en vandig NaHCO<sub>3</sub>-  
 15 opløsning og derpå med vand. Efter koncentreret efterfulgt af storkning med methanol/ether opnåedes 5,072 g Boc-Phe-Leu-Arg(Tos)-CH<sub>3</sub>Arg(Tos)-D-Leu-NHC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>.

Smp.: 127-132°C (dek.)

TLC: Rf-værdi 0,66 (methanol/chloroform, 1:7)

20 Optisk drejning:  $[\alpha]_D = -25,4^\circ$  (C = 1, methanol)

Elementaranalyse for C<sub>55</sub>H<sub>84</sub>N<sub>12</sub>O<sub>11</sub>S<sub>2</sub>·CH<sub>3</sub>OH:

|              | C     | H    | N     |
|--------------|-------|------|-------|
| beregnet (%) | 56,74 | 7,48 | 14,18 |
| fundet (%)   | 56,64 | 7,33 | 13,86 |

25

6) Syntese af Boc-CH<sub>3</sub>Tyr((Cl<sub>2</sub>Bzl)-Gly-Gly-OH)

9,09 g Boc-CH<sub>3</sub>Tyr(Cl<sub>2</sub>Bzl)OH,  $[\alpha]_D = -49^\circ$  (C = 1, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH), syntetiseret ved en af S.T. Cheung et al. beskrevet metode [Can. J. Chem., 55, 906(1977)], og  
 30 2,53 g N-hydroxysuccinimid blev opløst i 150 ml tetrahydrofuran. Efter afkøling med is sattes 4,12 g dicyclohexylcarbodiimid til opløsningen, og blandingen blev omrørt natten over i køleskab. De således dannede hvide krystaller blev frafiltreret, og der blev til  
 35 filtratet sat 2,91 g H-Gly-Gly-OH og 38 ml af en vandig opløsning af 1,848 g NaHCO<sub>3</sub>. Blanding blev omrørt ved stuetemperatur i to dage og derpå koncentreret.

Der blev tilsat en fortyndet vandig citronsyreopløsning og ethylacetat, og ethylacetatlaget blev fraskilt. Efter vask med vand efterfulgt af koncentrering blev produktet rensset ved silicagelsøjlechromatografi  
 5 elueret med MeOH/CHCl<sub>3</sub> = 1/30 og størknet med ether/n-hexan, hvorved opnåedes 9,23 g Boc-CH<sub>3</sub>Tyr(Cl<sub>2</sub>Bzl)-Gly-Gly-OH.

Smp.: 70-80°C (dek.)

10 TLC: Rf-værdi 0,79 (methanol/eddikesyre/chloroform, 4:1:12)

Optisk drejning:  $[\alpha]_D = -47^\circ$  (C = 1, methanol)

Elementaranalyse for C<sub>26</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>Cl<sub>2</sub> · 1/2C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>:

|               | C     | H    | N    |
|---------------|-------|------|------|
| beregnet (%)  | 55,54 | 5,99 | 6,94 |
| 15 fundet (%) | 55,45 | 5,81 | 6,89 |

7) Syntese af Boc-CH<sub>3</sub>Tyr(Cl<sub>2</sub>Bzl)-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg(Tos)-CH<sub>3</sub>Arg(Tos)-D-Leu-NHC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>

682 mg Boc-CH<sub>3</sub>Tyr(Cl<sub>2</sub>Bzl)-Gly-Gly-OH og 195 mg  
 20 N-hydroxybenzotriazol blev opløst i 4 ml dimethylformamid. Der blev til opløsningen sat 272 mg dicyclohexylcarbodiimid under afkøling med is. Efter omrøring i 2 timer sattes en opløsning af 1,167 g CF<sub>3</sub>COOH · H-Phe-Leu-Arg(Tos)-CH<sub>3</sub>Arg(Tos)-D-Leu-NHC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, syntetiseret  
 25 ved behandling af Boc-Phe-Leu-Arg(Tos)-CH<sub>3</sub>Arg(Tos)-D-Leu-NHC<sub>2</sub>H<sub>5</sub> med CF<sub>3</sub>COOH i nærværelse af anisol, og 0,132 ml N-methylmorpholin i 8 ml dimethylformamid til opløsningen, og blandingen blev omrørt i et køleskab natten over. Et således dannet bundfald blev frafiltreret,  
 30 og filtratet blev koncentreret og rensset ved silicagelsøjlechromatografi (elueringsmiddel: MeOH/CHCl<sub>3</sub> = 1/20). Efter størkning med methanol/ether opnåedes 1,391 g Boc-CH<sub>3</sub>Tyr(Cl<sub>2</sub>Bzl)-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg(Tos)-CH<sub>3</sub>Arg(Tos)-D-Leu-NHC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>.

35 Smp.: 130-135°C (dek.)

TLC: Rf-værdi 0,64 (methanol/chloroform, 1:7)

Optisk drejning:  $[\alpha]_D = -35,3^\circ$  (C = 1, methanol)



Elementaranalyse for  $C_{76}H_{105}N_{15}O_{15}S_2Cl_2 \cdot CH_3OH \cdot H_2O$ 

|              | C     | H    | N     |
|--------------|-------|------|-------|
| beregnet (%) | 55,92 | 6,77 | 12,70 |
| fundet (%)   | 56,06 | 6,49 | 12,52 |

5

8) Syntese af  $CH_3Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-CH_3Arg-D-Leu-NHC_2H_5$ 

220 mg Boc- $CH_3Tyr(Cl_2Bzl)-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg(Tos)-CH_3Arg(Tos)-D-Leu-NHC_2H_5$  blev opløst i 10 ml hydrogenfluorid (HF) i nærværelse af 0,2 ml anisol i en lukket HF-reaktionsbeholder ved  $-5^{\circ}C$ . Opløsningen blev omrørt 1 time og derpå blev HF afdestilleret fra reaktionssystemet. Remanensen blev vasket med ether og opløst i vand. Opløsningen blev behandlet med Amberlite IRA-93 (eddikesyretypen) og frysetørret. 120 mg af et således opnået rått peptid blev rensat ved HPLC [Nucleosil 5 C 18, 2  $\emptyset$  x 25 cm, elueret med 0,1% HCl ( $H_2O-CH_3CN$ , 81/91)] og derpå frysetørret, hvorved opnåedes 70 mg  $CH_3Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-CH_3Arg-D-Leu-NHC_2H_5$ .

20

TLC: Rf-værdi 0,70 (butanol/eddikesyre/pyridin/vand, 15:5:5:8)

Optisk drejning:  $[\alpha]_D = -21,8^{\circ}$  (C = 0,4, 0,01 N-HCl)

25

M.S. (FAB): 1036 ( $[M+H]^+$ )

Aminosyreanalyse:

Gly 1,87(2) Leu 1,96(2) Phe 1,00(1)

Arg 0,95(1)

(toppe, der skyldes  $CH_3Tyr$  og  $CH_3Arg$ , blev ikke beregnet).

30

## Eksempel 2

Syntese af  $Tyr-D-Cys-Gly-Phe-Cys-Arg-CH_3Arg-D-Leu-Arg-NH_2$

35

1) Syntese af Boc-D-Leu-Arg(Tos)- $NH_2$ 

2,493 g Boc-D-Leu-OH $\cdot H_2O$  blev opløst i 10 ml dimethylformamid. Opløsningen blev afkølet til  $-20^{\circ}C$ .

Der tilsattes 1,1 ml N-methylmorpholin og 0,96 ml ethylchlorcarbonat. Efter 5 minutters forløb blev der tilsat en opløsning af 4,414 g  $\text{CF}_3\text{COOH}\cdot\text{H-Arg(Tos)-NH}_2$  og 1,65 ml N-methylmorpholin i 20 ml dimethylformamid, og blandingen blev omrørt ved ca.  $-5^\circ\text{C}$  i 2 timer. Efter koncentrerings blev remanensen opløst i ethylacetat og vasket med  $\text{NaHCO}_3$  og derpå med vand. Efter koncentrerings blev der tilsat ether til størkning af produktet. Der opnåedes således 4,96 g Boc-D-Leu-Arg(Tos)- $\text{NH}_2$ .

|    |  |       |       |
|----|--|-------|-------|
| 10 | Smp.: $110-120^\circ\text{C}$ (dek.)   |       |       |
|    | TLC: Rf-værdi 0,49 (methanol/chloroform, 1:7)  |       |       |
|    | Optisk drejning: $[\alpha]_D = +13,0^\circ$ (C = 1, methanol)  |       |       |
|    | Elementaranalyse for $\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{N}_6\text{O}_6\text{S}\cdot 1/3\text{H}_2\text{O}$ : |       |       |
|    |  | C     | H     |
|    |  |       | N     |
| 15 | beregnet (%)   | 52,73 | 7,50  |
|    | fundet (%)   | 52,77 | 7,60  |
|    |  |       | 15,37 |
|    |  |       | 15,14 |

## 2) Syntese af Z- $\text{CH}_3\text{Arg(Tos)-D-Leu-Arg(Tos)-NH}_2$

3,336 g Z- $\text{CH}_3\text{Arg(Tos)-OH}$  blev opløst i 30 ml tetrahydrofuran. Opløsningen blev afkølet til  $-20^\circ\text{C}$ . Der blev til opløsningen sat 0,77 ml N-methylmorpholin og 0,67 ml ethylchlorcarbonat. Efter 5 minutters forløb tilsattes en opløsning af 3,882 g  $\text{CF}_3\text{COOH}\cdot\text{H-D-Leu-Arg(Tos)-NH}_2$ , syntetiseret ved behandling af Boc-D-Leu-Arg(Tos)- $\text{NH}_2$  med  $\text{CF}_3\text{COOH}$  i nærværelse af anisol, og 1,17 ml triethylamin i 30 ml tetrahydrofuran, og blandingen blev omrørt ved ca.  $-5^\circ\text{C}$  i 2 timer. Efter koncentrerings efterfulgt af størkning med methanol/vand opnåedes 6,14 g Z- $\text{CH}_3\text{Arg(Tos)-D-Leu-Arg(Tos)-NH}_2$ .

|    |   |       |       |
|----|---|-------|-------|
| 30 | Smp.: $100-113^\circ\text{C}$ (dek.)  |       |       |
|    | TLC: Rf-værdi 0,44 (methanol/chloroform, 1:7)   |       |       |
|    | Optisk drejning: $[\alpha]_D = -3,4^\circ$ (C = 1, methanol) :  |       |       |
|    | Elementaranalyse for $\text{C}_{41}\text{H}_{58}\text{N}_{10}\text{O}_9\text{S}_2\cdot\text{CH}_3\text{OH}$ : |       |       |
|    |   | C     | H     |
|    |   |       | N     |
| 35 | beregnet (%)  | 54,18 | 6,71  |
|    | fundet (%)  | 54,12 | 6,62  |
|    |   |       | 15,04 |
|    |   |       | 14,85 |

25

3) Syntese af Boc-Arg(Tos)-CH<sub>3</sub>Arg(Tos)-D-Leu-Arg(Tos)-NH<sub>2</sub>

4,734 g CH<sub>3</sub>Arg(Tos)-D-Leu-Arg(Tos)-NH<sub>2</sub>, opnået ved katalytisk reduktion af Z-CH<sub>3</sub>Arg(Tos)-D-Leu-Arg(Tos)-NH<sub>2</sub> i nærværelse af Pd/C, 2,918 g Boc-Arg(Tos)OH og 1,1 g N-hydroxybenzotriazol blev opløst i 17 ml dimethylformamid. Der blev til opløsningen sat 1,543 g dicyclohexylcarbodiimid under afkøling med is, og blandingen blev omrørt i køleskab een dag og derpå ved stuetemperatur een dag. Et således dannet bundfald blev frafiltreret, og filtratet blev koncentreret. Remanensen blev rensed ved silicagelsøjlechromatografi (elueret med MeOH/CHCl<sub>3</sub> = 1/15) og bragt til størkning med ether, hvorved opnåedes 4,917 g Boc-Arg(Tos)-CH<sub>3</sub>Arg(Tos)-D-Leu-Arg(Tos)-NH<sub>2</sub>.

Smp.: 131-136°C (dek.)

TLC: Rf-værdi 0,44 (methanol/chloroform, 1:7)

Optisk drejning:  $[\alpha]_D = -16,7^\circ$  (C = 1, methanol)

Elementaranalyse for C<sub>51</sub>H<sub>78</sub>N<sub>14</sub>O<sub>12</sub>S<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O:

|              | C     | H    | N     |
|--------------|-------|------|-------|
| beregnet (%) | 51,32 | 6,76 | 16,43 |
| fundet (%)   | 51,15 | 6,54 | 16,48 |

4) Syntese af Boc-Cys(CH<sub>3</sub>Bzl)-Arg(Tos)-CH<sub>3</sub>Arg(Tos)-D-Leu-Arg(Tos)-NH<sub>2</sub>

747 mg Boc-Cys(CH<sub>3</sub>Bzl)-OH blev opløst i 4 ml dimethylformamid. Opløsningen blev afkølet til -20°C. Der blev tilsat 0,254 ml N-methylmorpholin og 0,221 ml ethylchlorcarbonat. Efter 5 minutters forløb blev der til opløsningen sat en opløsning af 2,497 g CF<sub>3</sub>COOH·H-Arg(Tos)-CH<sub>3</sub>Arg(Tos)-D-Leu-Arg(Tos)-NH<sub>2</sub>, syntetiseret ved behandling af Boc-Arg(Tos)-CH<sub>3</sub>Arg(Tos)-D-Leu-Arg(Tos)-NH<sub>2</sub> med CF<sub>3</sub>COOH i nærværelse af anisol, og 0,277 ml N-methylmorpholin i 6 ml dimethylformamid, og blandingen blev omrørt ved ca. -5°C i 2 timer. Efter koncentreret blev blandingen opløst i ethylacetat og derpå vasket med NaHCO<sub>3</sub> og derefter med vand. Efter yderligere koncentreret blev produktet

størknet med methanol/ether, hvorved opnåedes 2,548 g  
Boc-Cys(CH<sub>3</sub>Bzl)-Arg(Tos)-CH<sub>3</sub>Arg(Tos)-D-Leu-Arg(Tos)-NH<sub>2</sub>.

Smp.: 126-132°C (dek.)

TLC: Rf-værdi 0,51 (methanol/chloroform, 1:7)

5 Optisk drejning:  $[\alpha]_D = -20,6^\circ$  (C = 1, methanol)

Elementaranalyse for C<sub>62</sub>H<sub>91</sub>N<sub>15</sub>O<sub>13</sub>S<sub>4</sub>·CH<sub>3</sub>OH·H<sub>2</sub>O:

|              | C     | H    | N     |
|--------------|-------|------|-------|
| beregnet (%) | 52,81 | 6,82 | 14,66 |
| fundet (%)   | 52,78 | 6,43 | 14,29 |

10

5) Syntese af Boc-Phe-Cys(CH<sub>3</sub>Bzl)-Arg(Tos)-CH<sub>3</sub>Arg(Tos)-  
D-Leu-Arg(Tos)-NH<sub>2</sub>

467 mg Boc-Phe-OH blev opløst i dimethylformamid. Opløsningen blev afkølet til -20°C. Der blev  
15 til opløsningen sat 0,194 ml N-methylmorpholin og 0,168 ml ethylchlorcarbonat. Efter 5 minutters forløb til-sattes en opløsning af 2,234 g CF<sub>3</sub>COOH·H-Phe-Cys(CH<sub>3</sub>Bzl)-Arg(Tos)-CH<sub>3</sub>Arg(Tos)-D-Leu-Arg(Tos)-NH<sub>2</sub>, syntetiseret ved behandling af Boc-Phe-Cys(CH<sub>3</sub>Bzl)-Arg(Tos)-CH<sub>3</sub>Arg(Tos)-D-Leu-Arg(Tos)-NH<sub>2</sub> med CF<sub>3</sub>COOH i nærværelse af  
20 anisol, og 0,211 ml N-methylmorpholin i 5 ml dimethylformamid, og blandingen blev omrørt ved ca. -5°C i 2 timer. Efter koncentrering blev remanensen opløst i ethylacetat, og opløsningen blev vasket med en vandig NaHCO<sub>3</sub>-opløsning og derpå med vand. Efter yderligere koncentrering blev produktet størknet med methanol/ether, hvorved opnåedes 2,126 g Boc-Phe-Cys(CH<sub>3</sub>Bzl)-Arg(Tos)-CH<sub>3</sub>Arg(Tos)-D-Leu-Arg(Tos)-NH<sub>2</sub>.

25

Smp.: 124-130°C (dek.)

30

TLC: Rf-værdi 0,56 (methanol/chloroform, 1:7)

Optisk drejning:  $[\alpha]_D = -18,9^\circ$  (C = 1, methanol)

Elementaranalyse for C<sub>71</sub>H<sub>100</sub>N<sub>16</sub>O<sub>14</sub>S<sub>4</sub>·5/2CH<sub>3</sub>OH:

|               | C     | H    | N     |
|---------------|-------|------|-------|
| beregnet (%)  | 54,83 | 6,89 | 13,91 |
| 35 fundet (%) | 54,62 | 6,34 | 13,64 |

6) Syntese af Boc-D-Cys(CH<sub>3</sub>Bzl)-Gly-OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>

3,233 g Boc-D-Cys(CH<sub>3</sub>Bzl)OH blev opløst i 15 ml dimethylformamid. Opløsningen blev afkølet til -20°C. Der blev til opløsningen sat 1,1 ml N-methylmorpholin og 0,956 ml ethylchlorcarbonat. Efter 5 minutters forløb tilsattes en opløsning af 1,396 g HCl·H-Gly-OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub> og 1,1 ml N-methylmorpholin i 20 ml dimethylformamid, og blandingen blev omrørt ved ca. -5°C i 2 timer. Efter koncentrerings blev remanensen opløst i ethylacetat, og opløsningen blev vasket med en vandig NaHCO<sub>3</sub>-opløsning og derpå med vand. Efter koncentrerings blev tilsat n-hexan for størkning af produktet. Der opnåedes således 3,6 g Boc-D-Cys-Gly-OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>.

Smp.: 80-82°C

15 TLC: Rf-værdi 0,74 (chloroform/ethylacetat, 2:1)

Optisk drejning:  $[\alpha]_D = +30,2^\circ$  (C = 1, methanol)

Elementaranalyse for C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S:

|               | C     | H    | N    |
|---------------|-------|------|------|
| beregnet (%)  | 58,51 | 7,37 | 6,82 |
| 20 fundet (%) | 58,35 | 7,23 | 6,69 |

7) Syntese af Boc-Tyr(Cl<sub>2</sub>Bzl)-D-Cys(CH<sub>3</sub>Bzl)-Gly-OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>

2,068 g Boc-Tyr(Cl<sub>2</sub>Bzl)-OH blev opløst i 20 ml tetrahydrofuran. Opløsningen blev afkølet til -20°C. Der sattes 0,517 ml N-methylmorpholin og 0,45 ml ethylchlorcarbonat til opløsningen. Efter 5 minutters forløb sattes en opløsning af 1,94 g CF<sub>3</sub>COOH·H-D-Cys(CH<sub>3</sub>Bzl)-Gly-OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, syntetiseret ved behandling af Boc-D-Cys(CH<sub>3</sub>Bzl)-Gly-OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub> med CF<sub>3</sub>COOH i nærværelse af anisol, og 1 ml triethylamin i 20 ml tetrahydrofuran til opløsningen, og blandingen blev omrørt ved ca. -5°C i 2 timer. Efter koncentrerings tilsattes vand for dannelse af et bundfald. Bundfaldet blev frafiltreret og opløst i en blanding af methanol og chloroform. Efter 35 koncentrerings tilsattes ether for størkning af produktet. Der opnåedes således 2,661 g Boc-Tyr(Cl<sub>2</sub>Bzl)-D-Cys(CH<sub>3</sub>Bzl)-Gly-OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>.

Smp.: 149-150°C

TLC: Rf-værdi 0,63 (chloroform/ethylacetat, 2:1)

Optisk drejning:  $[\alpha]_D = +17,0^\circ$  (C = 1, dimethylformamid)

5

Elementaranalyse for  $C_{36}H_{43}N_3O_7SCl_2$ :

|              | C     | H    | N    |
|--------------|-------|------|------|
| beregnet (%) | 59,01 | 5,91 | 5,73 |
| fundet (%)   | 58,94 | 5,75 | 5,62 |

10 8) Syntese af Boc-Tyr(Cl<sub>2</sub>Bzl)-D-Cys(CH<sub>3</sub>Bzl)-Gly-OH

2,345 g Boc-Tyr(Cl<sub>2</sub>Bzl)-D-Cys(CH<sub>3</sub>Bzl)-Gly-OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub> blev opløst i 30 ml tetrahydrofuran og der tilsattes derpå 3,2 ml N-NaOH. Blandingen blev omrørt ved stuetemperatur i 1 time. Der sattes 3,2 ml N-HCl til blandingen. Den resulterende blanding blev koncentreret. Der blev tilsat vand for styrkning af produktet. Der opnåedes således 1,899 g Boc-Tyr(Cl<sub>2</sub>Bzl)-D-Cys(CH<sub>3</sub>Bzl)-Gly-OH.

Smp.: 133-138°C (dek.)

TLC: Rf-værdi 0,25 (methanol/chloroform, 1:7)

20 Optisk drejning  $[\alpha]_D = +35,8^\circ$  (C = 1, methanol)

Elementaranalyse for  $C_{34}H_{39}N_3O_7SCl_2$ :

|              | C     | H    | N    |
|--------------|-------|------|------|
| beregnet (%) | 57,95 | 5,58 | 5,96 |
| fundet (%)   | 57,81 | 5,33 | 5,92 |

25

9) Syntese af Boc-Tyr(Cl<sub>2</sub>Bzl)-D-Cys(CH<sub>3</sub>Bzl)-Gly-Phe-Cys(CH<sub>3</sub>Bzl)-Arg(Tos)-CH<sub>3</sub>Arg(Tos)-D-Leu-Arg(Tos)-NH<sub>2</sub>

983 mg Boc-Tyr(Cl<sub>2</sub>Bzl)-D-Cys(CH<sub>3</sub>Bzl)-Gly-OH og 226 mg N-hydroxybenzotriazol blev opløst i 5 ml dimethylformamid. Der blev til opløsningen sat 316 mg dicyclohexylcarbodiimid under afkøling med is. Efter omrøring i 2 timer blev der til opløsningen sat en opløsning af 1,94 g CF<sub>3</sub>COOH·H-Phe-Cys(CH<sub>3</sub>Bzl)-Arg(Tos)-CH<sub>3</sub>Arg(Tos)-D-Leu-Arg(Tos)-NH<sub>2</sub>, syntetiseret ved behandling af Boc-Phe-Cys(CH<sub>3</sub>Bzl)-Arg(Tos)-CH<sub>3</sub>Arg(Tos)-D-Leu-Arg(Tos)-NH<sub>2</sub> med CF<sub>3</sub>COOH i nærværelse af anisol, og 0,167 ml N-methylmorpholin i 10 ml dimethyl-

30

35

formamid, og blandingen blev omrørt i køleskab natten over. Et således dannet bundfald blev frafiltreret. Efter silicagelsøjlechromatografi (eluering med MeOH/CHCl<sub>3</sub> = 1/20) efterfulgt af størkning med methanol/ether opnåedes 2,0 g Boc-Tyr(Cl<sub>2</sub>Bzl)-D-Cys(CH<sub>3</sub>Bzl)-Gly-Phe-Cys(CH<sub>3</sub>Bzl)-Arg(Tos)-CH<sub>3</sub>Arg(Tos)-D-Leu-Arg(Tos)-NH<sub>2</sub>.

Smp.: 123-230°C (dek.)

TLC: Rf-værdi 0,63 (methanol/chloroform, 1:7)

10 Optisk drejning:  $[\alpha]_D = -17,5^\circ$  (C = 1, dimethylformamid)

Elementaranalyse for C<sub>100</sub>H<sub>129</sub>N<sub>19</sub>O<sub>18</sub>S<sub>5</sub>Cl<sub>2</sub>·

C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>·3/2CH<sub>3</sub>OH:

|                 | C     | H    | N     |
|-----------------|-------|------|-------|
| 15 beregnet (%) | 56,60 | 6,52 | 11,89 |
| fundet (%)      | 56,38 | 6,18 | 11,72 |

10) Syntese af Tyr-D-Cys-Gly-Phe-Cys-Arg-CH<sub>3</sub>Arg-D-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>

20 515 mg Boc-Tyr(Cl<sub>2</sub>Bzl)-D-Cys(CH<sub>3</sub>Bzl)-Gly-Phe-Cys(CH<sub>3</sub>Bzl)-Arg(Tos)-CH<sub>3</sub>Arg(Tos)-D-Leu-Arg(Tos)-NH<sub>2</sub> blev opløst i 20 ml HF i nærværelse af 2 ml anisol ved -5°C i en lukket hydrogenfluorid (HF)-reaktionsbeholder. Opløsningen blev omrørt i 2 timer, og derpå blev

25 HF afdestilleret fra reaktionssystemet. Remanensen blev vasket med ether og opløst i vand. Opløsningen blev behandlet med Amberlite IRA-93 (eddikesyretype) og derpå frysetørret. 320 mg af det tørre produkt blev opløst i 1,3 liter vand, og opløsningen blev indstillet

30 på pH 8 med vandig ammoniak. Der blev indført luft under omrøring i 2 dage, og blandingen blev indstillet på pH 6 og derpå frysetørret. Det således opnåede rå peptid blev rensat ved HPLC [Nucleosil 5 C 18, 2 Ø x 25 cm, elueret med 0,05% HCl (H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN, 88/12)] og

35 frysetørret til opnåelse af 140 mg Try-D-Cys-Gly-Phe-Cys-Arg-CH<sub>3</sub>Arg-D-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>.

TLC: Rf-værdi 0,56 (butanol/eddikesyre/pyridin/vand, 15:5:5:8)

Optisk drejning:  $[\alpha]_D = -29^\circ$  (C = 0,4, 0,01N-HCl)

M.S. (FAB): 1183 ( $[M+H]^+$ )

Aminosyreanalyse:

5 Gly 1,02(1) Cys 1,83(2) Leu 1,04(1)  
 Tyr 0,80(1) Phe 1,00(1) Arg 2,06(2)  
 (En top, der skyldes  $CH_3Arg$ , blev ikke beregnet)

#### Eksempler 3-29

10 De i tabel 5 viste forbindelser blev syntetise-  
 ret ved den samme konventionelle flydende-fase-proces  
 som i eksemplerne 1 og 2. Ved disse forsøg blev dynor-  
 phinderivater, der var modificeret i stillingerne 1 til  
 3 (Tyr-Gly-Gly), i stillingerne 4 til 7 (Phe-Leu-Arg-  
 Arg), i stillingerne 4 til 8 (Phe-Leu-Arg-Arg-Ile) og  
 15 i stillingerne 4 til 9 (Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg), syntetiseret ved  
 den trinvis fremgangsmåde, idet man startede fra C-ter-  
 minalen i hvert peptid. Derpå blev derivaterne i  
 stillingerne 1 til 3 og derivaterne i stillingerne  
 4 til 7, 4 til 8 eller 4 til 9 sammenkondenseret ved  
 20 DCC-HOBT-metoden eller blandet anhydrid-metoden. Alle  
 beskyttelsesgrupperne blev fjernet med hydrogenfluorid  
 (HF), og produktet blev rensset ved præparativ HPLC under  
 anvendelse af en "reversed phase"-bærer. I eksempel  
 24 blev alle beskyttelsesgrupperne fjernet med HF, og  
 25 forbindelsen blev oxideret med luft og derpå rensset  
 ved præparativ HPLC. Reaktionsvejene ved syntesen af  
 de respektive beskyttede peptider er vist i figurerne  
 1 til 5.

30 Resultaterne af bestemmelsen af optisk drejning  
 $[\alpha]_D^{20}$ , TLC Rf-værdi og aminosyreanalyse af de opnåe-  
 de ønskede peptider er vist i tabel 6.




Tabel 5

| Eks. | Forbindelse   |
|------|---|
| 3    | CH <sub>3</sub> Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-NH <sub>2</sub>   |
| 4    | CH <sub>3</sub> Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-NHCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>         |
| 5    | CH <sub>3</sub> Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-D-Leu-OH  |
| 6    | CH <sub>3</sub> Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-D-Leu-OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>  |
| 7    | CH <sub>3</sub> Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-D-Leu-NH <sub>2</sub>   |
| 8    | CH <sub>3</sub> Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-D-Leu-NHC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>   |
| 9    | CH <sub>3</sub> Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-D-Leu-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>                       |
| 10   | CH <sub>3</sub> Tyr-Gly-Gly-Phe(p-NO <sub>2</sub> )-Leu-Arg-Arg-D-Leu-NH <sub>2</sub>                                     |
| 11   | CH <sub>3</sub> Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-homoArg-Arg-D-Leu-NH <sub>2</sub>   |
| 12   | CH <sub>3</sub> Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-D-Leu-NH <sub>2</sub>   |
| 13   | CH <sub>3</sub> Tyr-Gly-Gly-CH <sub>3</sub> Phe-Leu-Arg-Arg-D-Leu-NH <sub>2</sub>   |
| 14   | CH <sub>3</sub> Tyr-Gly-Gly-Phe-CH <sub>3</sub> Leu-Arg-Arg-D-Leu-NH <sub>2</sub>   |
| 15   | CH <sub>3</sub> Tyr-Gly-Gly-D-Phe-Leu-Arg-Arg-D-Leu-NH <sub>2</sub>   |
| 16   | Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-D-Leu-NH <sub>2</sub>   |
| 17   | Tyr-Sar-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-D-Leu-NH <sub>2</sub>   |
| 18   | CH <sub>3</sub> Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-CH <sub>3</sub> Arg-Arg-D-Leu-NH <sub>2</sub>   |
| 19   | CH <sub>3</sub> Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-CH <sub>3</sub> Arg-D-Leu-NH <sub>2</sub>   |
| 20   | CH <sub>3</sub> Tyr-Gly-Gly-Phe-tert-Leu-Arg-CH <sub>3</sub> Arg-D-Leu-NHC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>                    |
| 21   | CH <sub>3</sub> Tyr-Gly-Gly-Phe(p-NO <sub>2</sub> )-Leu-Arg-CH <sub>3</sub> Arg-D-Leu-NHC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>     |
| 22   | CH <sub>3</sub> Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Lys-CH <sub>3</sub> Arg-D-Leu-NH <sub>2</sub>   |
| 23   | Tyr-D-Ser-Gly-Phe-Ser-Arg-CH <sub>3</sub> Arg-D-Leu-NHC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>                                       |
| 24   | Tyr-D-Cys-Gly-Phe-Cys-Arg-CH <sub>3</sub> Arg-D-Leu-NHC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>                                       |
| 25   | CH <sub>3</sub> Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-D-Leu-Arg-NH <sub>2</sub>   |
| 26   | CH <sub>3</sub> Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-D-Glu-Arg-NH <sub>2</sub>   |
| 27   | CH <sub>3</sub> Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-CH <sub>3</sub> Arg-D-Leu-Arg-NHC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>                     |
| 28   | CH <sub>3</sub> Tyr-Gly-Gly-Phe(p-NO <sub>2</sub> )-Leu-Arg-CH <sub>3</sub> Arg-D-Leu-Arg-NHC <sub>2</sub> H <sub>5</sub> |
| 29   | CH <sub>3</sub> Tyr-Gly-Gly-Phe-Met(O)-Arg-CH <sub>3</sub> Arg-D-Leu-Arg-NH <sub>2</sub>                                  |

tert-Leu : (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CCH(NH<sub>2</sub>)COOH

homoArg : NH<sub>2</sub>C(=NH)NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(NH<sub>2</sub>)COOH

Phe(p-NO<sub>2</sub>) : NO<sub>2</sub>--CH<sub>2</sub>CH(NH<sub>2</sub>)COOH

Sar : CH<sub>3</sub>NHCH<sub>2</sub>COOH

Fig. 1 Eksempler 3 og 4

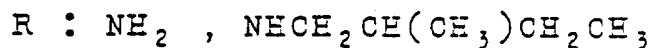
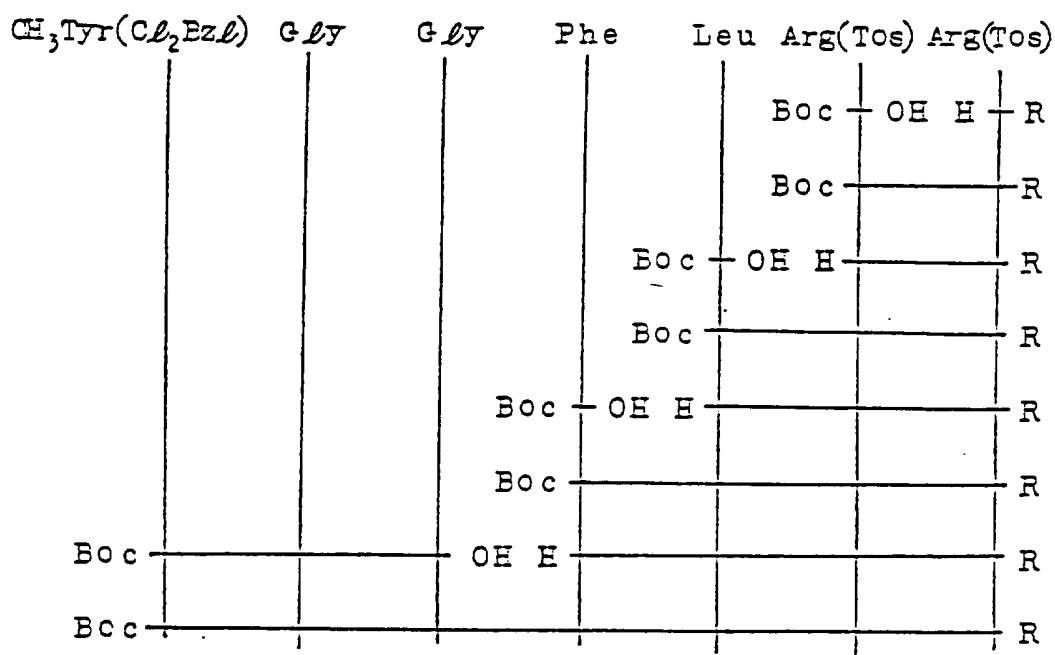
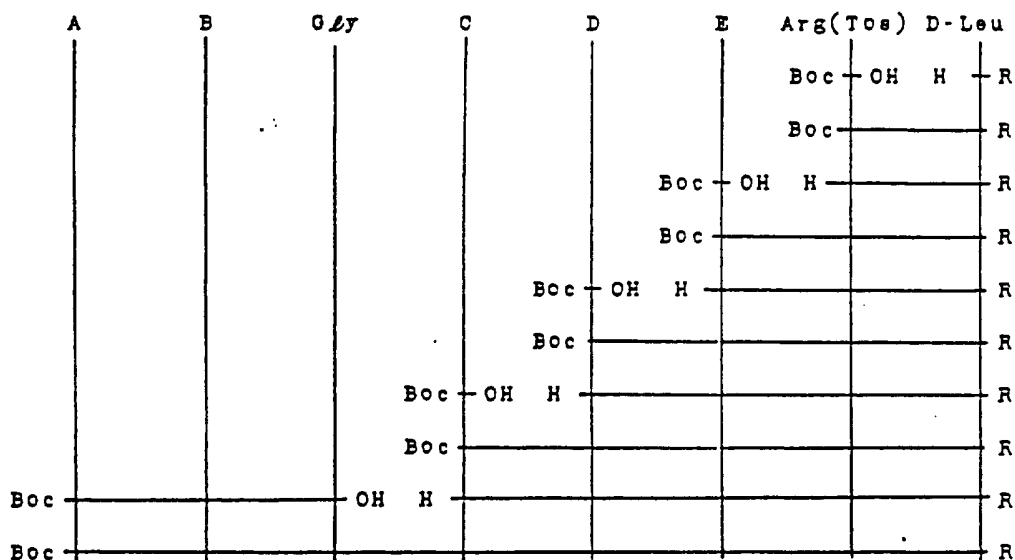


Fig. 2 Eksempler 5-18

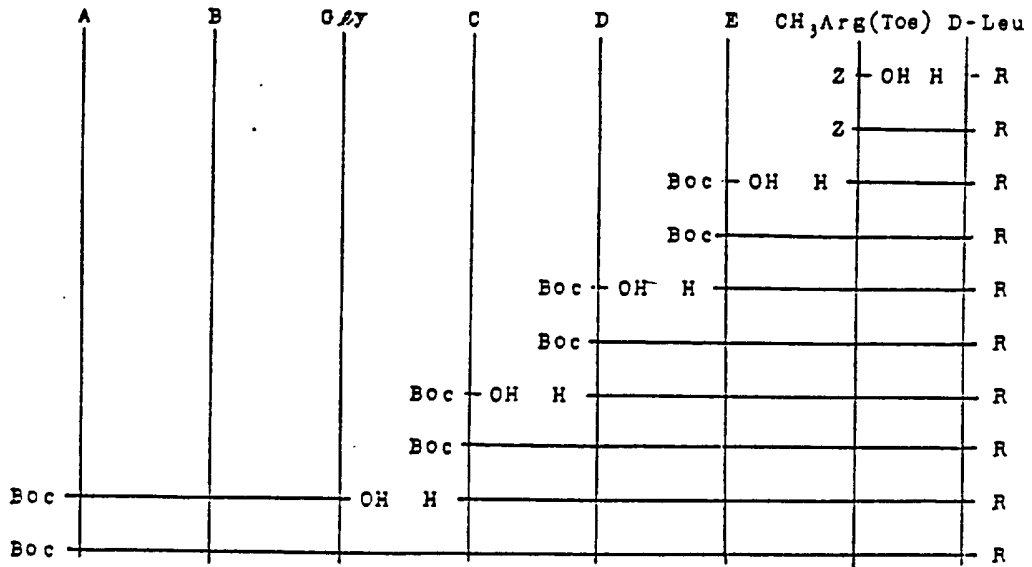


A : Tyr( $\text{Cl}_2\text{Bzl}$ ),  $\text{CH}_3\text{Tyr}(\text{Cl}_2\text{Bzl})$ . B : Gly, D-Ala, Sar. C : Phe, D-Phe,  $\text{CH}_3\text{Phe}$ , Phe(p- $\text{NO}_2$ ). D : Leu,  $\text{CH}_3\text{Leu}$ . E : Arg(Tos), homoArg(Tos).

R : OBzl,  $\text{OC}_2\text{H}_5$ ,  $\text{NH}_2$ ,  $\text{NHC}_2\text{H}_5$ ,  $\text{NH}(\text{CH}_2)_3$ ,  $\text{CH}_3$

(I eksemplerne 11 og 18 benyttedes Z-homoArg(Tos)OH henholdsvis S- $\text{CH}_3\text{Arg}(\text{Tos})\text{OH}$  som den beskyttede aminosyre E.)

Fig. 3 Eksempler 19-24

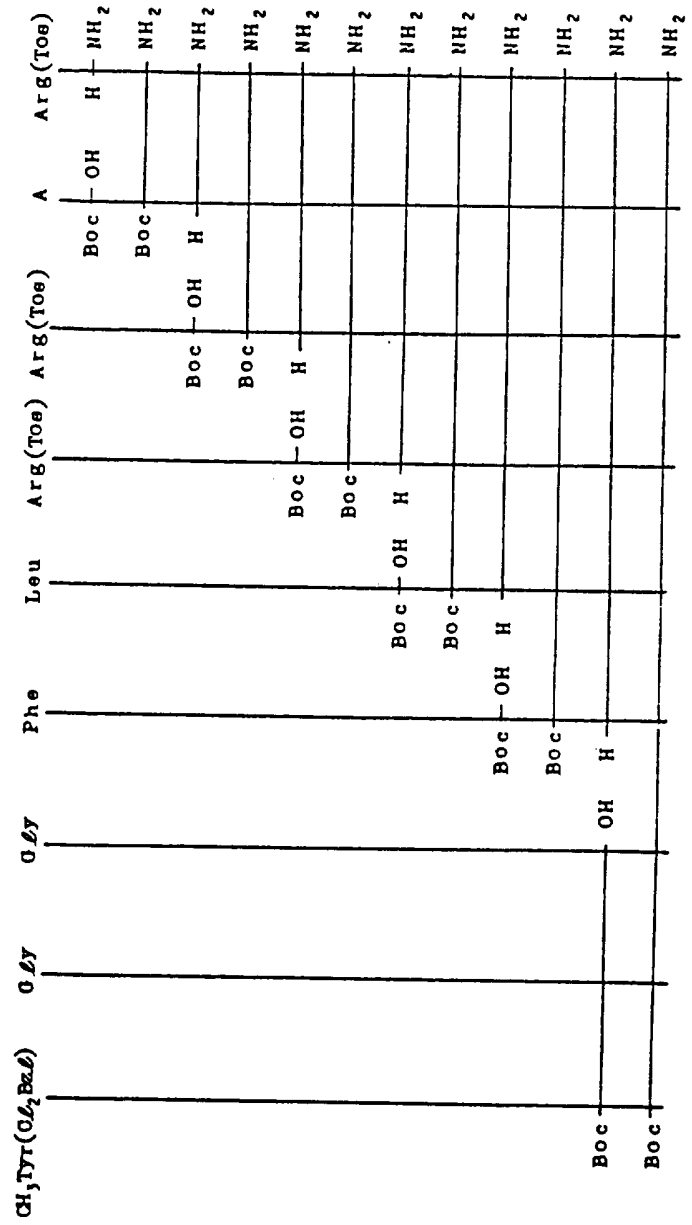


A : Tyr(Cl<sub>2</sub>Bzl), CH<sub>3</sub>Tyr(Cl<sub>2</sub>Bzl). B : GLY, D-Ser(Bzl), D-Cys(CH<sub>3</sub>Bzl).

C : Phe, Phe(p-NO<sub>2</sub>). D : Leu, tert-Leu, Ser(Bzl), Cys(CH<sub>3</sub>Bzl).

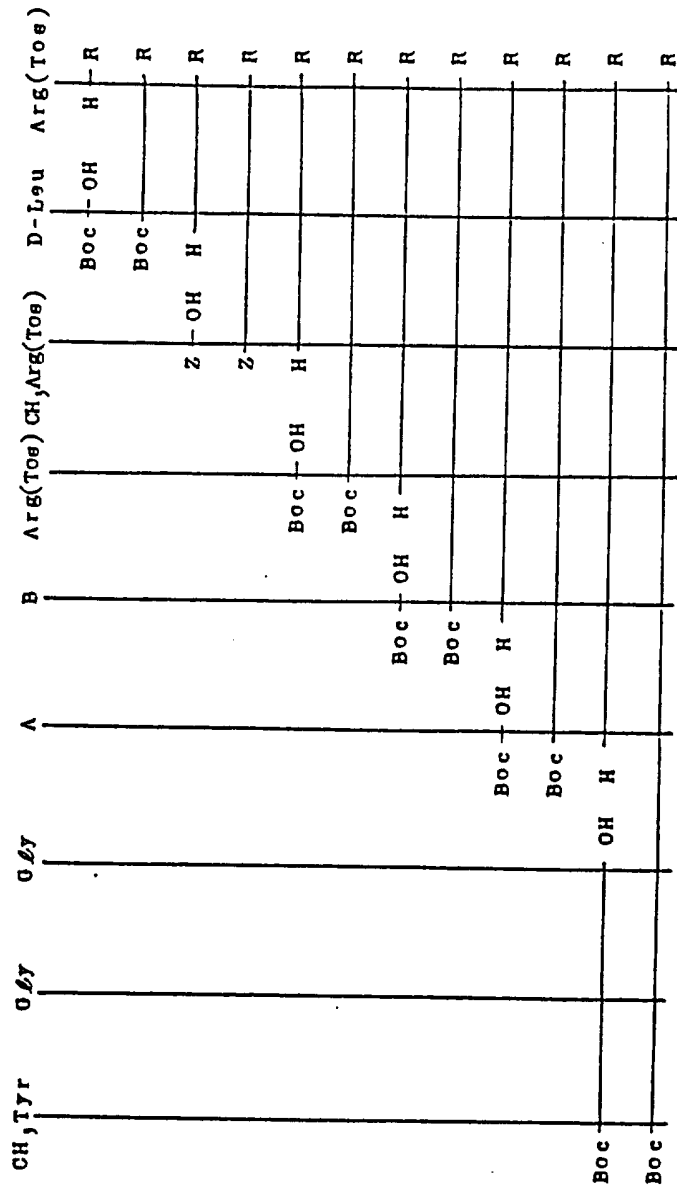
E : Arg(Tos), Lys(Z). R : NH<sub>2</sub>, NHC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>

Fig. 4 Eksempler 25 og 26



A : D-Leu , D-OLu(OBzL)

Fig. 5 Eksempler 27 og 29



A : Phe , Phe(p-NO<sub>2</sub>) . B : Leu , Met(O) . R : NH<sub>2</sub> , NHC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>

Tabel 6

| Eksampel | $[\alpha]_D^{20}$ | TLC Rf-værdi | Aminosyreanalyse                                      |
|----------|-------------------|--------------|---|
| 3        | -6,7°             | 0,53         | 0,87 Leu 1,03, Phe 1,00, Arg 2,30                     |
| 4        | -12,1°            | 0,62         | 0,87 Leu 1,00, Phe 1,00, Arg 2,01                     |
| 5        | -1,0°             | 0,65         | 0,87 Leu 2,00, Phe 1,00, Arg 1,99                     |
| 6        | +0,8°             | 0,63         | 0,87 Leu 1,96, Phe 1,00, Arg 1,97                     |
| 7        | -7,5°             | 0,62         | 0,87 Leu 1,96, Phe 1,00, Arg 1,97                     |
| 8        | +5,0°             | 0,64         | 0,87 Leu 2,14, Phe 1,00, Arg 2,18                     |
| 9        | +1,0°             | 0,68         | 0,87 Leu 1,95, Phe 1,00, Arg 1,95                     |
| 10       | +3,4°             | 0,59         | 0,87 Leu 2,00, Arg 2,01                               |
| 11       | -4,2°             | 0,61         | 0,87 Leu 1,96, Phe 1,00, Arg 1,01                     |
| 12       | +13,9°            | 0,60         | 0,87 Leu 1,96, Phe 1,00, Arg 1,98, Ala 1,00           |
| 13       | -17,2°            | 0,60         | 0,87 Leu 2,00, Arg 2,03                               |
| 14       | -11,5°            | 0,61         | 0,87 Leu 1,02, Phe 1,00, Arg 2,03                     |
| 15       | -12,0°            | 0,67         | 0,87 Leu 1,93, Phe 1,00, Arg 1,94                     |
| 16       | +15,0°            | 0,69         | 0,87 Leu 1,97, Phe 1,00, Arg 1,99, Ala 1,03, Tyr 0,95 |
| 17       | -3,0°             | 0,64         | 0,87 Leu 1,98, Phe 1,00, Arg 2,00, Tyr 0,89           |
| 18       | -19,7°            | 0,59         | 0,87 Leu 1,91, Phe 1,00, Arg 0,90                     |
| 19       | -23,4°            | 0,62         | 0,87 Leu 1,95, Phe 1,00, Arg 0,99                     |

Tabel 6 (fortsat)

| Eksem-<br>pel | $[\alpha]_{20}^D$ | TLC<br>Rf-værdi | Aminosyreanalyse                                      |
|---------------|-------------------|-----------------|---|
| 20            | -19,1°            | 0,70            | 0,87 Leu 1,01, Phe 1,00, Arg 0,99                     |
| 21            | -16,6°            | 0,69            | 0,87 Leu 2,00, Arg 0,99                               |
| 22            | -23,5°            | 0,62            | 0,87 Leu 1,99, Phe 1,00, Lys 1,03                     |
| 23            | -4,0°             | 0,65            | 0,87 Leu 1,00, Phe 1,00, Arg 1,01, Ser 1,72, Tyr 1,00 |
| 24            | -29,1°            | 0,70            | 0,87 Leu 1,05, Phe 1,00, Arg 1,02, Tyr 0,82, Cys 1,89 |
| 25            | -7,0°             | 0,64            | 0,87 Leu 2,00, Phe 1,00, Arg 3,22                     |
| 26            | -6,1°             | 0,43            | 0,87 Leu 0,98, Phe 1,00, Arg 2,95, Glu 0,98           |
| 27            | -31,0°            | 0,62            | 0,87 Leu 1,90, Phe 1,00, Arg 1,91                     |
| 28            | -27,2°            | 0,52            | 0,87 Leu 2,00, Arg 2,03                               |
| 29            | -23,0°            | 0,46            | 0,87 Leu 1,00, Phe 1,00, Arg 1,97                     |

Ved aminosyreanalysen bestemtes kun mængderne af aminosyrerne Gly, Leu, Phe, Arg, Ala, Tyr, Lys, Ser, Cys og Glu.

$[\alpha]_{20}^D$  betegnelse; C = 0,4 0,01N-HCl

TLC Rf-værdi betegnelse; butanol/eddikesyre/pyridin/vand = 15:5:5:8

## Eksempel 30

Syntese af  $\text{CH}_3$  Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg- $\text{CH}_3$ Arg-D-Ala-OH1) SYntese af X- $\text{CH}_3$ Arg(Tos)-D-Ala-OBu<sup>t</sup>:

3,336 g Z- $\text{CH}_3$ Arg(Tos)OH blev opløst i 20 ml  
 5 tetrahydrofuran. Opløsningen blev afkølet til  $-30^\circ\text{C}$ .  
 Der blev sat 0,77 ml N-methylmorpholin og 0,669 ml  
 ethylchlorcarbonat til opløsningen. Efter 5 minutters  
 forløb tilsattes en opløsning af 1,272 g HCl-H-D-Ala-  
 OBu<sup>t</sup> og 1,16 ml N-methylmorpholin i 20 ml tetrahydro-  
 10 furan, og blandingen blev omrørt ved ca.  $-5^\circ\text{C}$  i 2 ti-  
 mer. Efter koncentrerings blev remanensen opløst i  
 ethylacetat og vasket med en vandig  $\text{NaHCO}_3$ -opløsning  
 og derpå med vand. Efter koncentrerings til tørhed op-  
 nåedes 4,16 g glasagtig Z- $\text{CH}_3$ Arg(Tos)-D-Ala-OBu<sup>t</sup>.

15 TLC: Rf-værdi 0,69 (methanol/chloroform, 1:7)  
 Optisk drejning:  $[\alpha]_D = -15,5^\circ$  (C = 1, methanol)

Elementaranalyse for  $\text{C}_{29}\text{H}_{41}\text{N}_5\text{O}_7\text{S}$ :

|               | C     | H    | N     |
|---------------|-------|------|-------|
| beregnet (%)  | 57,70 | 6,85 | 11,60 |
| 20 fundet (%) | 57,54 | 6,59 | 11,31 |

2) Syntese af Z-Arg(Tos)- $\text{CH}_3$ Arg(Tos)-D-Ala-OBu<sup>t</sup>

2,87 g  $\text{CH}_3$ Arg(Tos)-D-Ala-OBu<sup>t</sup>, opnået ved kataly-  
 tisk reduktion af Z- $\text{CH}_3$ Arg(Tos)-D-Ala-OBu<sup>t</sup> i nær-  
 25 værelse af Pd/C, 3,392 g Z-Arg(Tos)-OH og 1,188 g  
 N-hydroxybenzotriazol blev opløst i 10 ml dimethyl-  
 formamid. Der blev til opløsningen sat 1,662 g dicyclo-  
 hexylcarbodiimid under afkøling med is, og blandingen  
 blev omrørt i køleskab i to dage. Det således dannede  
 30 bundfald blev frafiltreret, og filtratet blev koncen-  
 treret. Remanensen blev rensset ved silicagelsøjle-  
 chromatografi (elueringsmiddel: methanol/chloroform =  
 1/20), hvorved opnåedes 2,04 g glasagtig Z-Arg(Tos)-  
 $\text{CH}_3$ Arg(Tos)-D-Ala-OBu<sup>t</sup>.

35 TLC: Rf-værdi 0,57 (methanol/chloroform, 1:7)  
 Optisk drejning:  $[\alpha]_D = -31,6^\circ$  (C = 1, methanol)



Elementaranalyse for  $C_{42}H_{59}N_9O_{10}S_2 \cdot 1/2H_2O$ 

|              | C     | H    | N     |
|--------------|-------|------|-------|
| beregnet (%) | 54,65 | 6,62 | 13,66 |
| fundet (%)   | 54,64 | 6,48 | 13,72 |

5

3) Syntese af Z-Leu-Arg(Tos)-CH<sub>3</sub>Arg(Tos)-D-Ala-OBu<sup>t</sup>

0,629 Z-Leu-OH blev opløst i 15 ml dimethylformamid. Opløsningen blev afkølet til -20°C. Der blev til opløsningen sat 0,261 ml N-methylmorpholin og 0,227 ml ethylchlorcarbonat. Efter 5 minutters forløb sættes en opløsning af 1,76 g HCl·H-Arg(Tos)-CH<sub>3</sub>Arg(Tos)-D-Ala-OBu<sup>t</sup>, fremstillet ved katalytisk reduktion af Z-Arg(Tos)-CH<sub>3</sub>Arg(Tos)-D-Ala-OBu<sup>t</sup> i nærværelse af Pd-C, og 0,356 ml N-methylmorpholin i 15 ml dimethylformamid til opløsningen, og blandingen blev omrørt ved ca. -5°C i 2 timer. Efter koncentration blev remanensen opløst i ethylacetat, og opløsningen blev vasket med en vandig NaHCO<sub>3</sub>-opløsning og derpå med vand. Efter koncentration til tørhed opnåedes 2,11 g glasagtig Z-Leu-Arg(Tos)-CH<sub>3</sub>Arg(Tos)-D-Ala-OBu<sup>t</sup>.

TLC: Rf-værdi 0,57 (methanol/chloroform, 1:7)  
 Optisk drejning:  $[\alpha]_D = -36,2^\circ$  (C = 1, methanol)  
 Elementaranalyse for  $C_{48}H_{70}N_{10}O_{11}S_2 \cdot 1/2CH_3COOC_2H_5$ :

|              | C     | H    | N     |
|--------------|-------|------|-------|
| beregnet (%) | 56,06 | 6,96 | 13,07 |
| fundet (%)   | 56,02 | 6,85 | 13,08 |

25

4) Syntese af Z-Phe-Leu-Arg(Tos)-CH<sub>3</sub>Arg(Tos)-D-Ala-OBu<sup>t</sup>

595 mg Z-Phe-OH blev opløst i 15 ml dimethylformamid. Opløsningen blev afkølet til -20°C. Der blev sat 0,219 ml N-methylmorpholin og 0,190 ml ethylchlorcarbonat til opløsningen. Efter 5 minutters forløb sættes en opløsning af 1,68 g HCl·H-Leu-Arg(Tos)-CH<sub>3</sub>Arg(Tos)-D-Ala-OBu<sup>t</sup>, fremstillet ved katalytisk reduktion af Z-Leu-Arg(Tos)-CH<sub>3</sub>Arg(Tos)-D-Ala-OBu<sup>t</sup> i nærværelse af Pd-C, og 0,299 ml N-methylmorpholin

35

i 15 ml dimethylformamid til opløsningen, og blandingen blev omrørt ved ca.  $-5^{\circ}\text{C}$  i 2 timer. Efter koncentrer-  
ring opløstes remanensen i ethylacetat, og opløsningen  
blev vasket med en vandig  $\text{NaHCO}_3$ -opløsning og derpå  
5 med vand. Opløsningsmidlet blev afdestilleret og der  
blev sat ether til remanensen. Efter dekantering efter-  
fulgt af koncentrerings til tørhed opnåedes 1,87 g glas-  
agtig Z-Phe-Leu-Arg(Tos)- $\text{CH}_3\text{Arg}(\text{Tos})$ -D-Ala-OBu<sup>t</sup>.

TLC: Rf-værdi 0,61 (methanol/chloroform, 1:7)

10 Optisk drejning:  $[\alpha]_{\text{D}} = -34,7^{\circ}$  (C = 1, methanol)

Elementaranalyse for  $\text{C}_{57}\text{H}_{79}\text{N}_{11}\text{O}_{12}\text{S}_2 \cdot \text{C}_2\text{H}_5\text{OC}_2\text{H}_5$ :

|              | C     | H    | N     |
|--------------|-------|------|-------|
| beregnet (%) | 58,68 | 7,19 | 12,34 |
| fundet (%)   | 58,66 | 6,83 | 12,42 |

15

5) Syntese af Boc- $\text{CH}_3\text{Tyr}(\text{Cl}_2\text{Bzl})$ -Gly-Gly-Phe-Leu-  
Arg(Tos)- $\text{CH}_3\text{Arg}(\text{Tos})$ -D-Ala-OBu<sup>t</sup>

969 mg Boc- $\text{CH}_3\text{Tyr}(\text{Cl}_2\text{Bzl})$ -Gly-Gly-OH blev opløst  
i 12 ml dimethylformamid. Opløsningen blev afkølet til  
20  $-20^{\circ}\text{C}$ . Der blev til opløsningen sat 0,188 ml N-methyl-  
morpholin og 0,163 ml ethylchlorcarbonat. Efter 5 mi-  
nutters forløb sættes en opløsning af 1,67 g HCl·H-Phe-  
Leu-Arg(Tos)- $\text{CH}_3\text{Arg}(\text{Tos})$ -D-Ala-OBu<sup>t</sup>, fremstillet ved  
katalytisk reduktion af Z-Phe-Leu-Arg(Tos)- $\text{CH}_3\text{Arg}(\text{Tos})$ -  
25 D-Ala-OBu<sup>t</sup> i nærværelse af Pd-C, og 0,256 ml N-methyl-  
morpholin i 15 ml dimethylformamid til opløsningen,  
og blandingen blev omrørt ved ca.  $-5^{\circ}\text{C}$  i 2 timer. Efter  
koncentrerings blev remanensen opløst i ethylacetat,  
og opløsningen blev vasket med en vandig  $\text{NaHCO}_3$ -opløs-  
30 ning og derpå med vand. Opløsningsmidlet blev afdestil-  
leret under formindsket tryk, og remanensen blev størk-  
net med methanol/ether, hvorved opnåedes 2,196 g  
Boc- $\text{CH}_3\text{Tyr}(\text{Cl}_2\text{Bzl})$ -Gly-Gly-Phe-Leu-Arg(Tos)- $\text{CH}_3\text{Arg}(\text{Tos})$ -  
D-Ala-OBu<sup>t</sup>.

35

Smp.:  $130-135^{\circ}\text{C}$  )dek.)

TLC: Rf-værdi 0,61 (methanol/chloroform, 1:7)

Optisk drejning:  $[\alpha]_{\text{D}} = -40,7^{\circ}$  (C = 1, methanol)

41

Elementaranalyse for  $C_{75}H_{102}N_{14}O_{16}S_2Cl_2 \cdot 2CH_3OH$ :

|              | C     | H    | N     |
|--------------|-------|------|-------|
| beregnet (%) | 55,89 | 6,70 | 11,85 |
| fundet (%)   | 55,95 | 6,42 | 11,78 |

5

6) Syntese af  $CH_3Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-CH_3Arg-D-Ala-OH$ 

200 mg Boc- $CH_3Tyr(Cl_2Bzl)-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg(Tos)-CH_3Arg(Tos)-D-Ala-OBu^t$  blev opløst i 10 ml HF ved  $-5^\circ C$  i nærværelse af 0,2 ml ansiol i en lukket hydrogenfluorid (HF) reaktionsbeholder. Opløsningen blev omrørt i 1 time, og HF blev afdestilleret fra reaktionssystemet. Remanensen blev vasket med ether og derpå opløst i vand. Opløsningen blev behandlet med Amberlite IRA-93- (eddikesyretype) og derpå frysetørret. 120 mg af det således opnåede rå peptid blev rensat ved HPLC [Nucleosil 5 C 18,  $2\phi \times 25$  cm, eluering med 0,05% HCl ( $H_2O/CH_3CN$ , 92:8)] og frysetørret, hvorved opnåedes 60 mg  $CH_3Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-CH_3Arg-D-Ala-OH$ .

TLC: Rf-værdi 0,54 (butanol/eddikesyre/pyridin/vand, 15:5:5:8)

Optisk drejning:  $[\alpha]_D = -35,1^\circ$  (C = 0,4, 0,01N-HCl)

M.S. (FAB): 967 ( $[M+H]^+$ )

Aminosyreanalyse:

Gly 1,95(2), Leu 1,00(1), Phe 1,00(1), Arg 0,99(1), Ala 1,01(1)  
(Toppe, der skyldtes  $CH_3Tyr$  og  $CH_3Arg$ , blev ikke beregnet)

30

## Eksempel 31

Syntese af  $CH_3Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-CH_3Arg-CH_3Ala-OH$ :1) Syntese af Z- $CH_3Arg(Tos)-CH_3Ala-OBu^t$ :

4,508 g Z- $CH_3Arg(Tos)OH$ , 1,683 g HCl· $CH_3Ala-OBu^t$ , 1,533 g N-hydroxybenzotriazol og 1,04 ml N-methylmorpholin blev opløst i 10 ml dimethylformamid. Der blev til opløsningen sat 2,144 g dicyclohexylcarbodiimid under afkøling med is, og blandingen blev omrørt i

35

køleskab natten over. Det således dannede bundfald blev frafiltreret, og filtratet blev koncentreret. Remanensen blev opløst i ethylacetat, og opløsningen blev vasket med en vandig citronsyreopløsning, vandig  $\text{NaHCO}_3$ -opløsning og derpå med vand. Efter koncentreret til tørhed opnåedes 4,24 g glasagtig Z- $\text{CH}_3$ -Arg(Tos)- $\text{CH}_3$ -Ala-OBu<sup>t</sup>.

TLC: Rf-værdi 0,61 (methanol/chloroform, 1:7)

Optisk drejning:  $[\alpha]_D = -57,8^\circ$  (C = 1, methanol)

10 Elementaranalyse for  $\text{C}_{30}\text{H}_{43}\text{N}_5\text{O}_7\text{S}$ :

|              | C     | H    | N     |
|--------------|-------|------|-------|
| beregnet (%) | 58,33 | 7,02 | 11,33 |
| fundet (%)   | 58,11 | 6,88 | 11,41 |

15 2) Syntese af Z-Arg(Tos)- $\text{CH}_3$ Arg(Tos)- $\text{CH}_3$ Ala-OBu<sup>t</sup>:

2,90 g  $\text{CH}_3$ Arg(Tos)- $\text{CH}_3$ Ala-OBu<sup>t</sup>, opnået ved katalytisk reduktion af Z- $\text{CH}_3$ Arg(Tos)- $\text{CH}_3$ Ala-OBu<sup>t</sup> i nærværelse af Pd-C, 3,329 g Z-Arg(Tos)OH og 1,166 g N-hydroxybenzotriazol blev opløst i 10 ml dimethylformamid. Der blev til opløsningen sat 1,359 g dicyclohexylcarbodiimid under afkøling med is, og blandingen blev omrørt i køleskab i 2 dage. Det således dannede bundfald blev frafiltreret, og filtratet blev koncentreret. Remanensen blev rensat ved silicagelsøjlechromatografi (elueringsmiddel: MeOH/ $\text{CHCl}_3$  = 1/15), hvorved opnåedes 2,1 g galsagtig Z-Arg(Tos)- $\text{CH}_3$ Arg(Tos)- $\text{CH}_3$ Ala-OBu<sup>t</sup>.

TLC: Rf-værdi 0,46 (methanol/chloroform, 1:7)

Optisk drejning:  $[\alpha]_D = -57,1^\circ$  (C = 1, methanol)

30 Elementaranalyse for  $\text{C}_{43}\text{H}_{61}\text{N}_9\text{O}_{10}\text{S}_2 \cdot 3/2\text{H}_2\text{O}$ :

|              | C     | H    | N     |
|--------------|-------|------|-------|
| beregnet (%) | 54,07 | 6,75 | 13,20 |
| fundet (%)   | 54,10 | 6,35 | 13,18 |

35 3) Syntese af Z-Leu-Arg(Tos)- $\text{CH}_3$ Arg(Tos)- $\text{CH}_3$ Ala-OBu<sup>t</sup>

247 g Z-Leu-OH blev opløst i 10 ml dimethylformamid. Opløsningen blev afkølet til  $-20^\circ\text{C}$ . Der blev til opløsningen sat 0,102 ml N-methylmorpholin og 0,089

ml ethylchlorcarbonat. Efter 5 minutters forløb sættes en opløsning af 700 mg  $\text{HCl}\cdot\text{H-Arg(Tos)-CH}_3\text{Arg(Tos)-CH}_3\text{Ala-OBu}^t$ , opnået ved katalytisk reduktion af  $\text{Z-Arg(Tos)-CH}_3\text{Arg(Tos)-CH}_3\text{Ala-OBu}^t$  i nærværelse af

5 Pd-C, og 0,139 ml N-methylmorpholin i 10 ml dimethylformamid til opløsningen, og blandingen blev omrørt ved ca.  $-5^\circ\text{C}$  i 2 timer. Efter koncentrerings blev remanensen opløst i ethylacetat, og opløsningen blev vasket med en vandig  $\text{NaHCO}_3$ -opløsning og derpå med vand.

10 Opløsningsmidlet blev afdestilleret, og der blev sat ether til remanensen. Efter dekantering efterfulgt af koncentrerings til tørhed opnåedes 0,86 g glasagtig  $\text{Z-Leu-Arg(Tos)-CH}_3\text{Arg(Tos)-CH}_3\text{Ala-OBu}^t$ .

TLC: Rf-værdi 0,48 (methanol/chloroform, 1:7)

15 Optisk drejning  $[\alpha]_D = -60,3^\circ$  (C = 1, methanol)

Elementaranalyse for  $\text{C}_{49}\text{H}_{72}\text{N}_{10}\text{O}_{11}\text{S}_2\cdot\text{C}_2\text{H}_5\text{OC}_2\text{H}_5$ :

|              | C     | H    | N     |
|--------------|-------|------|-------|
| beregnet (%) | 57,07 | 7,41 | 12,55 |
| fundet (%)   | 56,83 | 7,02 | 12,64 |

20

4) Syntese af  $\text{Z-Phe-Leu-Arg(Tos)-CH}_3\text{Arg(Tos)-CH}_3\text{Ala-OBu}^t$

224 mg Z-Phe-OH blev opløst i 7 ml dimethylformamid. Opløsningen blev afkølet til  $-20^\circ\text{C}$ . Der blev til opløsningen sat 0,082 ml N-methylmorpholin og 0,071

25 ml ethylchlorcarbonat. Efter 5 minutters forløb sættes der en opløsning af 640 mg  $\text{HCl}\cdot\text{H-Leu-Arg(Tos)-CH}_3\text{Arg(Tos)-CH}_3\text{-Ala-OBu}^t$ , fremstillet ved katalytisk reduktion af  $\text{Z-Leu-Arg(Tos)-CH}_3\text{Arg(Tos)-CH}_3\text{Ala-OBu}^t$  i nærværelse af Pd-C, og 0,112 ml N-methylmorpholin i 7 ml dime-

30 thylformamid til opløsningen, og blandingen blev omrørt ved ca.  $-5^\circ\text{C}$  i 2 timer. Efter koncentrerings blev remanensen opløst i ethylacetat, og opløsningen blev vasket med en vandig  $\text{NaHCO}_3$ -opløsning og derpå med vand.

Opløsningsmidlet blev afdestilleret og der blev sat

35 ether til remanensen. Efter dekantering efterfulgt af koncentrerings til tørhed opnåedes 770 mg glasagtig  $\text{Z-Phe-Leu-Arg(Tos)-CH}_3\text{Arg(Tos)-CH}_3\text{Ala-OBu}^t$ .

TLC: Rf-værdi 0,54 (methanol/chloroform, 1:7)

Optisk drejning:  $[\alpha]_D = -59,6^\circ$  (C = 1, methanol)

Elementaranalyse for  $C_{58}H_{81}N_{11}O_{12}S_2 \cdot C_2H_5OC_2H_5$ :

|                | C     | H    | N     |
|----------------|-------|------|-------|
| 5 beregnet (%) | 58,98 | 7,26 | 12,20 |
| fundet (%)     | 58,68 | 6,91 | 12,24 |

5) Syntese af Boc-CH<sub>3</sub>Tyr(Cl<sub>2</sub>Bzl)-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg(Tos)-CH<sub>3</sub>Arg(Tos)-CH<sub>3</sub>Ala-OBu<sup>t</sup>

- 10 350 mg Boc-CH<sub>3</sub>Tyr(Cl<sub>2</sub>Bzl)-Gly-Gly-OH blev opløst i 5 ml dimethylformamid. Opløsningen blev afkølet til -20°C. Der blev til opløsningen sat 0,068 ml N-methylmorpholin og 0,059 ml ethylchlorcarbonat. Efter 5 minutters forløb blev der sat en opløsning af 610 mg
- 15 HCl·H-Phe-Leu-Arg(Tos)-CH<sub>3</sub>Arg(Tos)-CH<sub>3</sub>Ala-OBu<sup>t</sup>, fremstillet ved katalytisk reduktion af Z-Phe-Leu-Arg(Tos)-CH<sub>3</sub>Arg(Tos)-CH<sub>3</sub>Ala-OBu<sup>t</sup> i nærværelse af Pd-C, og 0,092 ml N-methylmorpholin i 6 ml dimethylformamid til opløsningen, og blandingen blev omrørt ved ca. -5°C i
- 20 2 timer. Efter koncentrerings blev remanensen opløst i ethylacetat, og opløsningen blev vasket med en vandig NaHCO<sub>3</sub>-opløsning og derpå med vand. Efter koncentrerings efterfulgt af storkning med methanol/ether opnåedes
- 25 760 mg Boc-CH<sub>3</sub>Tyr(Cl<sub>2</sub>Bzl)-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg(Tos)-CH<sub>3</sub>Arg(Tos)-CH<sub>3</sub>Ala-OBu<sup>t</sup>.

Smp.: 125-133°C (dek.)

TLC: Rf-værdi 0,55 (methanol/chloroform, 1:7)

Optisk drejning:  $[\alpha]_D = -56,4^\circ$  (C = 1, methanol)

Elementaranalyse for  $C_{76}H_{104}N_{14}O_{16}S_2Cl_2 \cdot 1/2$

|                 | C     | H    | N     |
|-----------------|-------|------|-------|
| 30 beregnet (%) | 57,06 | 6,69 | 11,94 |
| fundet (%)      | 56,71 | 6,46 | 11,49 |

6) Syntese af CH<sub>3</sub>Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-CH<sub>3</sub>Arg-CH<sub>3</sub>Ala-OH

250 ml Boc-CH<sub>3</sub>Tyr(Cl<sub>2</sub>Bzl)-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg(Tos)-  
 CH<sub>3</sub>Arg(Tos)-CH<sub>3</sub>Ala-OBu<sup>t</sup> blev opløst i 10 ml HF ved -5°C i  
 5 nærværelse af 0,2 ml anisol i HF-reaktionsbeholderen  
 i et lukket system. Opløsningen blev omrørt i 1 time  
 og derpå blev HF afdestilleret fra reaktionssystemet.  
 Remanensen blev vasket med ether og opløst i vand.  
 Opløsningen blev behandlet med Amberlite IRA 93 (eddi-  
 10 kesyretype) og derpå frysetørret. 130 mg af det således  
 opnåede rå peptid blev rensat ved HPLC [Nucleosil 5 C  
 18, 2 ø x 25 cm, elueret med 0,05% HCl (H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN,  
 91:9)] og frysetørret, hvorved opnåedes 50 mg CH<sub>3</sub>Tyr-  
 Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-CH<sub>3</sub>Arg-CH<sub>3</sub>Ala-OH.

15 TLC: Rf-værdi 0,54 (butanol/eddikesyre/pyridin/  
 vand, 15:5:5:8)

Optisk drejning:  $[\alpha]_D^{20} = -64,7^\circ$  (C = 0,4,  
 0,01N-HCl)

M.S. (FAB): 981 ([M+H]<sup>+</sup>)

20 Aminosyreanalyse:

Gly 1,92(2), Leu 1,04(1), Phe 1,00(1),  
 Arg 0,986(1)

(Toppe der skyldtes CH<sub>3</sub>Tyr, CH<sub>3</sub>Arg og  
 CH<sub>3</sub>Ala blev ikke beregnet).

25

Eksempler 32-41

De i tabel 7 viste forbindelser blev synteti-  
 seret ved den samme konventionelle flydende-fase-proces  
 som i eksemplerne 30 og 31. Ved disse forsøg blev dynor-  
 30 phinderivater modificeret i stillingerne 1 til 3 (Tyr-  
 Gly-Gly), i stillingerne 4 til 8 (Phe-Leu-Arg-Arg-Ile),  
 i stillingerne 4 til 9 (Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg) og i  
 stillingerne 4 til 10 (Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro) syntetiseret  
 ved den trinvis proces, idet man gik ud fra C-termina-  
 35 len i hvert peptid. Derpå blev derivaterne i stillinger-  
 ne 1 til 3 og derivaterne i stillingerne 4 til 8,  
 4 til 9 eller 4 til 10 sammenkondenseret ved DCC-HOBt-  
 metoden eller blandet syreanhydridmetoden. Alle be-

skyttelsesgrupperne blev fjernet med hydrogenfluorid (HF), og produktet blev rensset ved præparativ HPLC under anvendelse af en reversed phase bærer. Reaktionsvejene ved syntesen af de respektive beskyttede peptider er vist i figurerne 6 til 8.

Resultaterne af bestemmelsen af optisk drejning  $[\alpha]_D^{20}$ , TLC Rf-værdi og aminosyreanalyse af de på ovennævnte måde opnåede ønskede peptider er vist i tabel 8.

10

Tabel 7

| <u>Eksempel</u> | <u>Forbindelse</u>   |
|-----------------|--|
| 32              | $\text{CH}_3\text{Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-CH}_3\text{Arg-Ile-OH}$              |
| 33              | $\text{CH}_3\text{Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-CH}_3\text{Arg-Asp-OH}$              |
| 15 34           | $\text{CH}_3\text{Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-CH}_3\text{Arg-D-Leu-OH}$            |
| 35              | $\text{CH}_3\text{Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-CH}_3\text{Arg-D-Glu-OH}$            |
| 36              | $\text{CH}_3\text{Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-CH}_3\text{Arg-CH}_3\text{Ile-OH}$   |
| 37              | $\text{CH}_3\text{Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-CH}_3\text{Arg-Sar-OH}$              |
| 20 38           | $\text{CH}_3\text{Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-CH}_3\text{Arg-}\beta\text{-Ala-OH}$ |
| 39              | $\text{CH}_3\text{Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-CH}_3\text{Arg-D-Leu-Asp-OH}$        |
| 40              | $\text{CH}_3\text{Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-CH}_3\text{Arg-D-Leu-Phe-OH}$        |
| 41              | $\text{CH}_3\text{Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-CH}_3\text{Arg-D-Leu-Arg-D-}$        |
| 25              | $\text{Glu-OH}$  |



Eksemplerne 32 til 38

Fig. 6

| CH <sub>3</sub> Tyr(Cl <sub>2</sub> Bzl) | Gly | Gly  | Phe | Leu  | Arg(Tos) | CH <sub>3</sub> Arg(Tos) | R                     |
|--|-----|------|-----|------|----------|--------------------------|-----------------------|
|  |     |      |     |      |          | Z                        | OH H OBU <sup>t</sup> |
|  |     |      |     |      |          | Z                        | OBU <sup>t</sup>      |
|  |     |      |     |      | Z        | OH H                     | OBU <sup>t</sup>      |
|  |     |      |     |      | Z        |                          | OBU <sup>t</sup>      |
|  |     |      |     | Z    | OH H     |                          | OBU <sup>t</sup>      |
|  |     |      |     | Z    |          |                          | OBU <sup>t</sup>      |
|  |     |      | Z   | OH H |          |                          | OBU <sup>t</sup>      |
|  |     |      | Z   |      |          |                          | OBU <sup>t</sup>      |
| Boc                                      |     | OH H |     |      |          |                          | OBU <sup>t</sup>      |
| Boc                                      |     |      |     |      |          |                          | OBU <sup>t</sup>      |

R: Ile, Asp(OBU<sup>t</sup>), D-Leu, D-Glu(OBU<sup>t</sup>), CH<sub>3</sub>Ile, Sar, β-Ala

Eksemplerne 39 til 40

Fig. 7

| CH <sub>3</sub> Tyr(Cl <sub>2</sub> Bzl) | Gly | Gly  | Phe  | Leu  | Arg(Tos) | CH <sub>3</sub> Arg(Tos) | D-Leu | R                     |
|--|-----|------|------|------|----------|--------------------------|-------|-----------------------|
|  |     |      |      |      |          |                          | Z     | OH H OBU <sup>t</sup> |
|  |     |      |      |      |          |                          | Z     | OBU <sup>t</sup>      |
|  |     |      |      |      | Z        | OH H                     |       | OBU <sup>t</sup>      |
|  |     |      |      |      | Z        |                          |       | OBU <sup>t</sup>      |
|  |     |      |      | Z    | OH H     |                          |       | OBU <sup>t</sup>      |
|  |     |      |      | Z    |          |                          |       | OBU <sup>t</sup>      |
|  |     |      | Z    | OH H |          |                          |       | OBU <sup>t</sup>      |
|  |     |      | Z    |      |          |                          |       | OBU <sup>t</sup>      |
|  |     | Z    | OH H |      |          |                          |       | OBU <sup>t</sup>      |
| Boc                                      |     | OH H |      |      |          |                          |       | OBU <sup>t</sup>      |
| Boc                                      |     |      |      |      |          |                          |       | OBU <sup>t</sup>      |

R: Asp(OBU<sup>t</sup>), Phe



Tabel 8

| Eksempel | $[\alpha]_D^{20}$ | TLC Rf - værdi | Aminosyreanalyse                                    |
|----------|-------------------|----------------|---|
| 32       | -10,6             | 0,63           | Gly 1,96, Leu 1,05, Phe 1,00,<br>Arg 1,01, Ile 0,99 |
| 33       | -35,4             | 0,48           | Gly 1,96, Leu 0,99, Phe 1,00,<br>Arg 0,99, Asp 1,01 |
| 34       | -32,4             | 0,68           | Gly 1,95, Leu 1,95, Phe 1,00,<br>Arg 0,99           |
| 35       | -30,8             | 0,51           | Gly 1,93, Leu 1,00, Phe 1,00,<br>Arg 1,00, Glu 1,01 |
| 36       | -67,1             | 0,63           | Gly 1,95, Leu 0,97, Phe 1,00,<br>Arg 0,96           |
| 37       | -23,9             | 0,51           | Gly 1,97, Leu 1,01, Phe 1,00,<br>Arg 1,00           |
| 38       | -29,2             | 0,56           | Gly 1,96, Leu 1,01, Phe 1,00,<br>Arg 1,01           |
| 39       | -28,6             | 0,58           | Gly 1,96, Leu 1,98, Phe 1,00,<br>Arg 1,00, Asp 1,06 |
| 40       | -25,0             | 0,70           | Gly 1,93, Leu 2,01, Phe 2,00,<br>Arg 0,96           |
| 41       | -30,8             | 0,51           | Gly 1,96, Leu 1,97, Phe 1,00,<br>Arg 1,99, Glu 1,01 |

Ved aminosyreanalysen blev kun mængderne af aminosyrerne Gly, Leu, Phe, Arg., Ile, Asp, og Glu bestemt.

$[\alpha]_D^{20}$  bestemmelse; C = 0,4, 0,01N-HCl

TLC-Rf-værdi bestemmelse; butanol/eddikesyre/  
pyridin/vand = 15:5:5:8

50

Nogle af de forbindelser, der blev opnået ifølge eksemplerne, blev testet på samme måde som omtalt ovenfor.

Tabel 9

| 5  | Prøveforbindelse | Haleknibningsmetode<br>(ED <sub>50</sub> , mg/kg) |      |
|----|------------------|---|------|
|    |                  | i.v.  | S.C. |
| 10 | Eksempel 30      | 0,7   | 1,9  |
|    | 31               | 0,5   | 1,2  |
|    | 34               | 2,1   | 0,9  |
|    | 36               | 0,2   | 0,4  |
|    | 38               | 1,7   | 0,6  |
|    | dynorphin (1-13) | >25,0   |      |

Tabel 10

| 15 | Prøveforbindelse  | Kanin-vas-deferens metode |
|----|-------------------|---------------------------|
|    |                   | IC <sub>50</sub> (nM)     |
| 20 | Eksempel 30       | 17,8                      |
|    | 31                | 24,5                      |
|    | 36                | 11,2                      |
|    | dynorphin A(1-17) | 17,4                      |

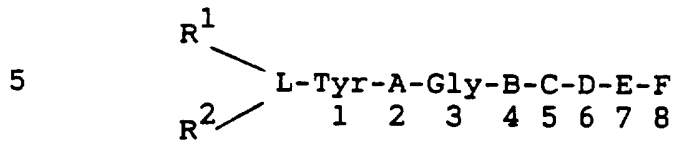
Tabel 11

| 25 | Prøveforbindelse | Haleknibnings-<br>metode | Mindste letale<br>dosis |
|----|------------------|--------------------------|-------------------------|
|    |                  | ED <sub>50</sub> (mg/kg) | (mg/kg)                 |
| 30 | Eksempel 30      | 1,9                      | >100                    |
|    | 31               | 1,2                      | >100                    |
|    | 36               | 0,4                      | >100                    |

35

## P A T E N T K R A V

1. Polypeptider med nedenstående almene formel (I)



hvori  $R^1$  og  $R^2$  hver er hydrogen eller lavere alkyl,

10 A er en D-aminosyre valgt fra D-Ala, D-Ser, D-Cys, Gly eller Sar med den betingelse, at når A er D-Cys er denne bundet til L-Cys eller D-Cys i 5-stillingen gennem en S-S-binding for at bevirke en intramolekylær ringslutning,

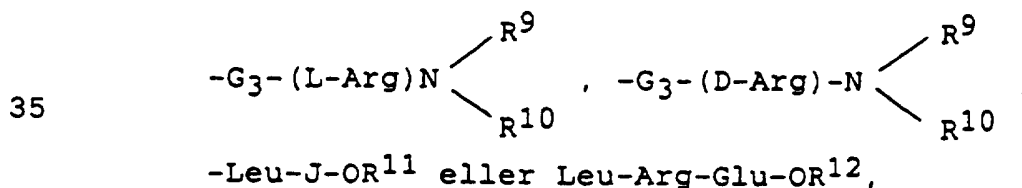
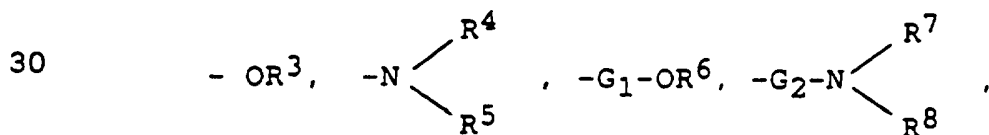
15 B er L-Phe eller D-Phe, hvori benzenringen eventuelt er substitueret med nitro eller lavere alkyl,

C står for L-Leu, L- $\text{CH}_3$ Leu, T-tert-Leu, L-Met(O), L-Ser, L-Cys eller D-Cys med den betingelse, at når A er D-Cys er C  
20 L-Lys eller D-Cys og C er bundet til A gennem den nævnte S-S-binding,

D er L-Arg, L-homo-Arg, L- $\text{CH}_3$ Arg eller L-Lys,

25 E er L- $\text{CH}_3$ Arg, L-Arg eller L-Leu,

F er



- hvori  $R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9, R^{10}, R^{11}$  og  $R^{12}$  er ens eller forskellige og hver er hydrogen eller lavere alkyl, og
- 5 hvori  $G_1$  er L- $CH_3$ -Ile, Sar, D-Ala, L-Asp, L-Ile, L- $CH_3$ Ala, L-Leu, L-Ala, L-Glu eller Aib  
 $G_2$  er L-Leu, L-Arg eller D-Leu  
 $G_3$  er L-Leu, L-Glu eller D-Leu
- 10 J er L-Phe, D-Phe, L-Asp eller D-Asp,

eller et farmakologisk acceptabelt salt deraf, k e n d e t e g n e t ved, at et beskyttet polypeptid med den ovennævnte formel fremstilles ved hjælp af væskefase- eller fastfasemetoden, og at en eller flere beskyttende grupper, for en eller flere reaktive grupper, derefter fjernes ved hjælp af en katalytisk reduktion eller brug af en blanding af flydende ammoniak og et alkalimetal, en syre, især flussyre, en base eller en hydrazinforbindelse, 20 til opnåelse af polypeptider, hvorefter et opnået polypeptid i baseform om ønsket omdannes til et farmakologisk acceptabelt salt.

2. Polypeptid ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at det er
- 25  $CH_3Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-CH_3Arg-D-Leu-NHC_2H_5,$   
 $Tyr-D-Cys-Gly-Phe-Cys-Arg-CH_3Arg-D-Leu-Arg-NH_2,$   
 $CH_3Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-CH_3Arg-D-Leu-NH_2,$   
 $Tyr-D-Cys-Gly-Phe-Cys-Arg-CH_3Arg-D-Leu-NHC_2H_5,$   
 $CH_3Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-CH_3Arg-D-Leu-Arg-NHC_2H_5,$   
30  $CH_3Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-CH_3Arg-D-Ala-OH,$   
 $CH_3Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-CH_3Arg-CH_3Ala-OH,$   
 $CH_3Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-CH_3Arg-CH_3Ile-OH,$   
 $CH_3Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-CH_3Arg-Aib-OH,$   
35  $CH_3Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-CH_3Arg-D-Leu-Sar-OH,$  eller  
 $Tyr-D-Cys-Gly-Phe-Cys-Arg-CH_3Arg-CH_3Ile-OH.$

3. Fremgangsmåde til fremstilling af polypeptider ifølge kravene 1 eller 2, kendt ved, at man ved en egnet fremgangsmåde fremstiller et polypeptid med en struktur svarende til formlen i krav 5 1, men i en beskyttet form, derpå fjerner beskyttelsesgrupperne til opnåelse af et polypeptid med den i krav 1 angivne formel og, om nødvendigt, omdanner polypeptidet til et farmakologisk acceptabelt salt deraf på i og for sig kendt måde.
- 10 4. Analgetikum, der som aktiv bestanddel indeholder et polypeptid som angivet i krav 1 eller 2, eller et farmakologisk acceptabelt salt deraf.