



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT  
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

① CH 658 662 A5

⑤ Int. Cl.4: C 07 K 7/06

// A 61 K 37/43, C 07 K 99:56

**Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein**

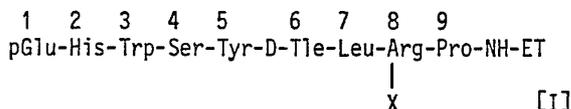
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑫ PATENTSCHRIFT A5

<p>⑲ Gesuchsnummer: 4271/83</p> <p>⑳ Anmeldungsdatum: 05.08.1983</p> <p>③① Priorität(en): 06.08.1982 CS 5868-82</p> <p>⑳④ Patent erteilt: 28.11.1986</p> <p>④⑤ Patentschrift veröffentlicht: 28.11.1986</p>	<p>⑳③ Inhaber: SPOFA Spojené Podniky pro Zdravotnickou Vyrobu, Prag 3 (CS)</p> <p>⑳⑦ Erfinder: Flegel, Martin, Prag 2 (CS) Pospisek, Jan, Prag 3 (CS) Picha, Josef, Prag 10 (CS) Pichova, Drahomira, Prag 10 (CS) Krojido, Milan, Prag 8 (CS) Kolinsky, Jiri, Prag 6 (CS)</p> <p>⑳④⑦ Vertreter: Patentanwalts-Bureau Isler AG, Zürich</p>
---	---

⑤④ **Gonadotrop hochwirksame Luteinierungs- und Follikelstimulierungshormon-Liberationsfaktoranaloge und Verfahren zu deren Herstellung.**

⑤⑦ Die neuen, biologisch wirksamen Nonapeptide entsprechen der allgemeinen Formel I

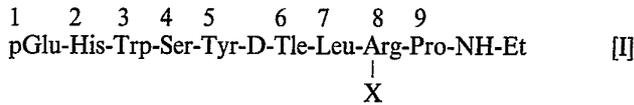


in welcher X Wasserstoff oder eine Schutzgruppe, z.B. die Toluolsulfonyl-, Nitro- oder Adamantylloxycarbonylgruppe bedeutet. Diese Verbindungen sind synthetische Analoge des Liberationsfaktors für das luteinierende und das follikelstimulierende Hormon und besitzen hohe gonadotrope Wirksamkeit. Die erfindungsgemässen Verbindungen haben Voraussetzungen für die Anwendung in der Human- sowie Veterinärmedizin, insbesondere zur Steuerung des Östralcyklus, zur Behandlung von Störungen des letzteren und als nicht-steroidale Empfängnisverhütungsmittel. Die Nonapeptidverbindungen der allgemeinen Formel I sind synthetisch glatt zugänglich, indem man die entsprechenden Aminosäuren- bzw. niederen Peptidreste unter

Verwendung präparativer Methoden der Peptidchemie miteinander verknüpft. Vorteilhafte originelle Verfahren zur Abspaltung der Tosylgruppe in 8-Stellung sowie zur Reingewinnung der Reaktionsprodukte sind beschrieben.

## PATENTANSPRÜCHE

1. Gonadotrop hochwirksame Luteinierungs- und Follikelstimulierungshormon-Liberationsfaktoranaloge der allgemeinen Formel I

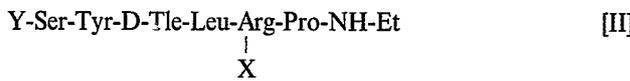


in welcher X Wasserstoff oder eine Schutzgruppe bedeutet.

2. Verbindungen nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass X die Toluolsulfonyl-, Nitro- oder Adamantyl-oxycarbonylgruppe bedeutet.

3. Verfahren zur Herstellung der Verbindungen nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man die entsprechenden Aminosäuren- bzw. niederen Peptidreste miteinander verknüpft.

4. Verfahren nach Patentanspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass man ein Hexapeptidderivat der allgemeinen Formel II

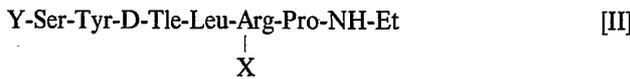


in welcher X dieselbe Bedeutung wie in Formel I hat und Y ein Wasserstoffatom oder eine temporäre hydrogenolytisch abspaltbare Schutzgruppe für die N-terminale Aminogruppe, vorzugsweise eine Benzyloxycarbonylgruppe, bedeutet, mit einem reaktionsfähigen Derivat des Tripeptides der Formel III



umsetzt.

5. Verfahren nach Patentanspruch 3 zur Herstellung der Verbindungen nach Patentanspruch 1, in welcher X Wasserstoff bedeutet, dadurch gekennzeichnet, dass man ein Hexapeptidderivat der Formel II



in welcher X eine Schutzgruppe bedeutet, und Y ein Wasserstoffatom oder eine temporäre hydrogenolytisch abspaltbare Schutzgruppe für die N-terminale Aminogruppe, vorzugsweise eine Benzyloxycarbonylgruppe bedeutet, mit einem reaktionsfähigen Derivat des Tripeptides der Formel III



umsetzt, wonach man die Schutzgruppe abspaltet.

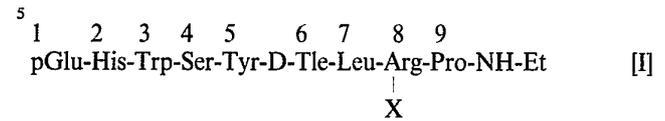
6. Verfahren nach Patentanspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass man die Abspaltung der p-Toluolsulfonyl-Schutzgruppe in 8-Stellung unter Verwendung einer Trifluormethansulfonsäurelösung in Trifluoressigsäure in Gegenwart eines Schutzmittels, vorzugsweise von Thioglycolsäure, durchführt, wonach man das Produkt in Reinform gewinnt.

7. Verfahren nach Patentanspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass man die Reingewinnung der Reaktionsprodukte mittels Phasenumkehr-Flüssigkeitschromatographie unter Verwendung einer Trifluoressigsäurelösung in wässrigem Methanol als der Mobilphase vornimmt.

Die vorliegende Erfindung betrifft synthetische Analoge des Liberationsfaktors für das luteinisierende und das folli-

2

kelstimulierende Hormon (LH + FSH). Diese synthetischen Analoge des natürlichen Liberationsfaktors (LRF, d.h. luteinizing hormone releasing factor) nach der Erfindung entsprechen der allgemeinen Formel I



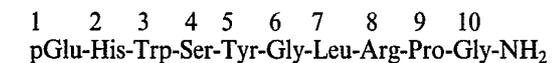
10 in welcher X Wasserstoff oder eine Schutzgruppe, z.B. die Toluolsulfonyl-, Nitro- oder Adamantyl-oxycarbonylgruppe bedeutet. Die anderen benutzten Abkürzungen haben in der Fachliteratur übliche Bedeutungen, und zwar Et ist eine Äthylgruppe und die nachstehenden Aminosäuresymbole bedeuten jeweils einen zweiwertigen Rest von

15	pGlu	Pyroglutaminsäure,
	His	Histidin,
	Trp	Tryptophan,
	Ser	Serin,
20	Tyr	Tyrosin,
	D-Tle	1-Amino-3,3-dimethyl-D-butansäure/tert-Leucin/,
	Leu	Leucin,
	Arg	Arginin und
25	Pro	Prolin.

Diese neuen biologisch aktiven Nonapeptide besitzen hohe gonadotrope Wirksamkeit und haben Voraussetzungen für die Anwendung in der Human- sowie Veterinärmedizin, insbesondere zur Steuerung des Oestralcyclus, zur Behandlung von Störungen des letzteren und als nichtsteroidale Empfängnisverhütungsmittel.

Bekanntlich wird der LH + FSH-Liberationsfaktor (LRF) im Hypothalamus erzeugt und bewirkt die Ausschüttung des LH + FSH aus dem Vorderlappen der Hypophyse. Die freigesetzten Hormone steuern die Spiegel von Steroidhormonen im Menschen sowie in Tieren beiderlei Geschlechts. Die LRF-Rezeptoren wurden auch unmittelbar im Gonadenbereich aufgefunden. Die agonistisch (d.h. hormonfreisetzend) wirksamen LRF-Analoga finden Anwendung in der Human- sowie Veterinärmedizin, u.a. zur Behandlung von Funktionalsterilität und Ovarialcysten. Ausserdem lässt es sich mit einigen gesteigert und langdauernd wirkenden LRF-Analogen auch der umgekehrte Effekt erzeugen, u.zw. die Hemmung der Ovulation und der Spermatogenese.

Das natürliche LRF-Dekapeptid der Formel



50 wird im Organismus enzymatisch rasch abgebaut, u.zw. durch Spaltung dessen pGlu-His, Tyr-Gly und Pro-Gly Bindungen. Man versuchte daher, anhand unterschiedlicher Abänderung der Aminosäurenreste in diesen entscheidenden Stellen beständigere Analoga zu gewinnen, die eine entsprechend abgeänderte bzw. möglichst gesteigerte und über längere Zeit anhaltende Wirkung haben könnten. So ergab z.B. der Ersatz von Gly in 6-Stellung durch verschiedene nicht-proteinogene D-Aminosäuren und deren Derivate, insbesondere von lipophilerem Charakter, agonistisch hochwirksame Verbindungen. Gleichzeitiges Ersetzen von Gly-NH<sub>2</sub> in 10-Stellung durch geeignete Alkylgruppen lieferte, infolge einer zusätzlichen Steigerung der LRF-Wirksamkeit, die sogenannten «superaktiven» Analoga. Diese, in niedrigen Dosen verabreicht, sind vom Nutzen insbesondere zur Behandlung von ovarialen Störungen und zum Auslösen der Ovulation im gesteuerten Reproduktionscyclus bei Melkkühen. Hohe Dosisierung dieser Wirkstoffe lässt sich dagegen z.B. zur kontrollierten Unterbrechung des Oestralcyclus beim

Schlachtvieh, zur nichtsteroiden Empfängnisverhütung und zur Behandlung von gewissen endokrin-bedingten Tumoren verwenden.

Eine systematische Untersuchung der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen unter Heranziehen von neuen Strukturänderungsmöglichkeiten führte nun zur Entwicklung von LRF-Analogen mit wesentlich gesteigerter biologischer Wirksamkeit und dementsprechend guten Voraussetzungen für die therapeutische Anwendung. So wurde z.B. nach der vorliegenden Erfindung der Glycinrest in 6-Stellung des natürlichen LRF durch einen zweiwertigen Rest einer neuen, in diesem Zusammenhang bisher nicht beschriebenen Aminosäure mit der D-Konfiguration ersetzt. Diese war der Rest von 1-Amino-3,3-dimethyl-D-butansäure (tert-Leucin). Deren aliphatische Seitenkette ist ziemlich lipophil und zugleich räumlich stark gehindert. Beide diese Umstände wirken sich günstig auf die biologischen Eigenschaften der LRF-Analogen aus, insbesondere auf deren Wirkungsstärke und Wirkungsdauer. Das resultierende 6-D-Tle LRF-Analog zeigt sich wesentlich beständiger gegenüber den metabolischen Einwirkungen und infolgedessen wirkt es prolongierter als solche Analoge, die einen Rest von O-tert-Butyl-D-serin oder eine aromatische Seitenkette, z.B. die von 3-(2-Naphthyl)-D-alanin, enthalten. Der natürliche 10-Gyl-NH<sub>2</sub>-Rest wurde am besten durch NHEt ersetzt.

Die teilweise geschützten Präkursoren solcher LRF-Analoge behalten einen wesentlichen Anteil der Aktivität der entsprechenden ungeschützten Verbindungen; so ist z.B. die Anwesenheit des freien Arg in 8-Stellung nicht entscheidend für hohe agonistische Wirksamkeit. Dieser Befund ist von zusätzlichem Gewicht, da er die vorteilhafte Möglichkeit bietet, den gewünschten biologischen Effekt, insbesondere in der Veterinärmedizin, unter Verwendung von diesen besser zugänglichen und daher billigeren Präkursoren zu erreichen. Ähnliche Verhältnisse wurden vorher u. a. im entgegengesetzten Falle einiger LRF-Analoge von inhibitorischer Wirkungsweise beschrieben.

Die erfindungsgemässen LRF-Analogen f und g (vgl. die weiter nachfolgenden Beispiele) verabfolgte man i. v. an ovariektomierte Färsen in Dosen von 10 und 200 µg. Der RIA-Test wurde in einem homologen System doppelter Antikörper durchgeführt (Stupnicki R., Mladej A.: *Endocrinology* 68, 6 (1976)). Das NIH-LER-1716-2-Rinderpräparat diente als Jodierungsstandard; die RIA-Empfindlichkeit war oberhalb 100 µg. Die STH-Prolactin-Kreuzreaktion betrug 1%. Die Testergebnisse sind in der folgenden Tabelle I zusammengestellt.

Tabelle I

Spiegel des LH + FSH nach der Verabreichung von 200 µg LRF bzw. Analogen

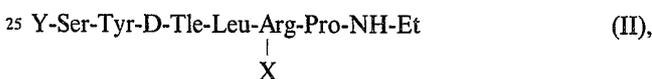
Verbindung	FS-Wirkung Eintritt, Min.	Wirkungs- dauer Min.	Ø FSH-Kon- zentration µg/ml
Kontrolle	–	–	31,2 ± 1,9
LRF	40 ± 11,5	100 ± 26,7	108,4 ± 16,1
Verbindung f	26,7 ± 3,8	43 ± 20,4	72,4 ± 10,9
Verbindung g	40,0 ± 6,0	230 ± 32,1	110,9 ± 11,7

Verbindung	Lut.-Wirkung Eintritt, Min.	Wirkungs- dauer Min.	Ø LH-Kon- zentration µg/ml
Kontrolle	–	–	0,26 ± 0,04
LRF	53,3 ± 13,9	12,3 ± 5,0	7,43 ± 1,6
Verbindung f	46,6 ± 15,4	86,7 ± 10,7	3,88 ± 1,3
Verbindung g	53,3 ± 19,0	236,7 ± 10	11,24 ± 1,59

Die Verbindung g zeigte in beiden o.a. Dosierungen einen stark ausgeprägten agonistischen Effekt; diese Verbindung war wirksamer als Verbindung f, d.h. das entsprechende Tosylderivat, und wesentlich stärker wirksam als der natürliche LRF; der letztere wurde als Referenzsubstanz für den Vergleich verwendet. Der Ersatz von Gly durch D-Tle nach der Erfindung erzeugte also eine bemerkenswerte Zunahme der Stärke sowie der Dauer der LRF-Wirkung; dies wurde schon bei der niederen Dosis von 10 µg pro Tier deutlich beobachtet. Auch der teilweise geschützte Präkursor f erwies eine bedeutsame Wirksamkeit. Dieser Befund bestätigt den weitgehenden Effekt der erwähnten Strukturänderung in 6-Stellung auf die Konformation (sterische Anordnung) des Peptidmoleküls. Der günstige Effekt dieser Änderung überwog stark die Wirksamkeitsabnahme infolge der Tosylierung von Arg in 8-Stellung des Dekapeptids; das entsprechende 8-Tosylderivat des natürlichen LRF war nämlich nahezu wirkungslos.

Die Nonapeptidverbindungen der Formel I sind synthetisch glatt zugänglich, indem man die entsprechenden Aminosäuren- bzw. niederen Peptidreste unter Verwendung präparativer Methoden der Peptidchemie miteinander verknüpft. Mit Vorteil geht man dabei so vor, dass man ein Hexapeptidderivat der allgemeinen Formel II



in der X dieselbe Bedeutung wie in der Formel I hat und Y ein Wasserstoffatom oder eine temporäre hydrogenolytisch abspaltbare Schutzgruppe für die N-terminale Aminogruppe, vorzugsweise eine Benzoyloxycarbonylgruppe bedeutet, mit einem reaktionsfähigen Derivat des Tripeptids der Formel III



umsetzt, wonach man erforderlichenfalls die Schutzgruppen abspaltet.

Die in Betracht kommenden Reaktionen lassen sich entweder in der Lösung durchführen, was die klassische Präparativtechnik der Peptidchemie darstellt (E. Schroeder, K. Lübke, *The Peptides*, Bd. I und II, Acad. Press, New York, 1965), oder man kann sie in der festen Phase zustandebringen (J.M. Stewart, J.D. Young, *Solid phase peptides synthesis*, W.H. Freeman Comp., San Francisco, 1969). Die terminalen Aminogruppen werden mit Vorteil durch Einführung einer Benzoyloxycarbonylgruppe vorübergehend geschützt. Die Funktionalgruppen in den Seitenketten – mit der einzigen Ausnahme von Arg – bedürfen des Schutzes in der Regel nicht; der Schutz der Guanidinderivats des Argininrestes in 8-Stellung erfolgt zweckmässig durch eine Tosylgruppe. Das Abspalten der letzteren lässt sich nach den üblichen Methoden durchführen, jedoch zeigt es sich empfehlenswert, diese unter Verwendung einer Trifluormethansulphon säurelösung in Trifluoressigsäure in Gegenwart eines geeigneten Schutzmittels, z.B. von Thioglykolsäure (vgl. die Beispiele) vorzunehmen. Diese neu entwickelte Arbeitsweise ermöglicht das rasche und zugleich schonende Abspalten der Tosylgruppe ohne jegliche unerwünschte Eingriffe in den Rest des empfindlichen Peptidmoleküls und liefert wesentlich höhere Ausbeuten des gewünschten Produktes als die bisher bekannten Spaltverfahren.

Nach dem Abspalten der Schutzgruppe lässt sich das erhaltene Produkt unmittelbar durch die Flüssigkeitschromatographie reinigen; dies ermöglicht, das erfindungsgemässe Nonapeptid mit hohem Reinheitsgrad zu gewinnen. Dazu verwendet man als stationäre Phase mit Vorteil die sogenannte «umgekehrte Phase» (reverse phase), d.h. Silikagel

(Körnung von 10 bis 30  $\mu\text{m}$ ), das an der Oberfläche mit einer chemisch gebundenen Schicht von  $\text{C}_8$  bis  $\text{C}_{18}$ -Kohlenwasserstoffen versehen ist. Die Eluierung erfolgt vorzugsweise mit einer Mobilphase, bestehend aus einem Gemisch von Methanol (20 bis 60 Vol.-% je nach der zu verarbeitenden Peptidverbindung) und einer 0,1 bis 0,5%igen, am besten 0,2%igen wässrigen Trifluoressigsäurelösung. Die Anwesenheit der letztgenannten Säure dient zum Unterdrücken der Ionisation der Stoffe und ist notwendig für eine wirksame Stofftrennung bzw. Reinigung. Diese Arbeitsweise ermöglicht, die zu verarbeitenden Produkte in einer einzigen Operation ohne zusätzliches Entsalzen effektiv zu reinigen.

Die Flüssigkeitschromatographie wurde bisher, soweit bekannt, für die Reinigung von Peptidverbindungen dieser Art noch nicht benutzt. Die erwähnte Mobilphase wurde als vorteilhafter Ersatz der vorher beschriebenen Eluierungssysteme mit Gehalt an Pufferlösungen verschiedener pH-Werte zur Ionisationsunterdrückung entwickelt. Unter Verwendung solcher gepufferten Mobilphasen musste man nämlich die so behandelten Produkte stets noch einer Entsalzung unterwerfen, was unbedingt mit zusätzlichem Zeitaufwand verbunden war.

Nähere Einzelheiten des Verfahrens zur Herstellung der biologisch aktiven Nonapeptidderivate gemäss der vorliegenden Erfindung sind dem nachstehenden Beispiel zu entnehmen. Im folgenden bedeuten: Z eine Benzylloxycarbonylgruppe, Tos eine Tosyl-, d.h. p-Toluolsulfonylgruppe und DCHA Dicyclohexylamin.

#### Beispiel

##### a) Z-Pro-NH-Et

Man löst 50 g (0,2 Mol) Z-Pro in 170 ml Dimethylformamid, gibt 21 ml Pyridin zu und kühlt die Lösung auf  $-40^\circ\text{C}$  ab. Dann setzt man 29 ml (0,22 Mol) Pivalylchlorid hinzu und rührt das Gemisch 10 Min. bei  $-30^\circ\text{C}$ . Nach Abkühlen auf  $-40^\circ\text{C}$  gibt man eine Lösung von 10 g (0,21 Mol) Äthylamin in 50 ml Dimethylformamid zu. Nach dem Stehen über Nacht bei  $0^\circ\text{C}$  dampft man das Dimethylformamid ab, den Rückstand löst man in Äthylacetat und die Lösung lässt man kristallisieren. Die Ausbeute ist 50 g (91% der Theorie) des Produktes, Schmp.  $125-130^\circ\text{C}$ .

##### b) Z-Arg(Tos)-Pro-NH-Et

Man spaltet von 4,5 g (16,2 mMol) Z-Pro-NH-Et die Schutzgruppe durch Einwirkung einer Bromwasserstofflösung in Essigsäure ab. Nach 20 Min. Stehen bei Raumtemperatur scheidet sich das Produkt als Hydrobromid durch Zugabe von Äther aus; man löst es sogleich in 30 ml Dimethylformamid.

Man zerlegt 10 g (17,8 mMol) Z-Arg(Tos) DCHA mit 2N Chlorwasserstoffsäure und das freigesetzte Z-Arg(Tos) nimmt man in Äthylacetat auf. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels gewinnt man das Produkt in Schaumform. Man löst das Rohprodukt in 60 ml Dimethylformamid, kühlt die Lösung auf  $-40^\circ\text{C}$  ab und bei dieser Temperatur versetzt man sie mit 1,4 ml (20 mMol) Pyridin, 2,2 ml N-Äthylpiperidin und 2,1 ml (18 mMol) Pivalylchlorid. Nach 20 Min. Rühren bei  $-30^\circ\text{C}$  lässt man die vorher bereitete Lösung von HBr Pro-NH-Et zufließen, stellt das Reaktionsgemisch mit N-Äthylpiperidin auf pH 7,5 und lässt es im Kühlschrank über Nacht. Danach dampft man die flüchtigen Anteile ab, den Rückstand nimmt man in Äthylacetat auf und den Äthylacetatextrakt wäscht man nacheinander mit 1N Chlorwasserstoffsäure, 5%iger Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser. Darauf destilliert man das Lösungsmittel unter gleichzeitiger azeotropischer Trocknung ab; so gewinnt man 6,02 g (63% der Theorie) des Produktes in Schaumform. Aminosäureanalyse: Pro 0,91, Arg 1,09.

##### c) Z-Leu-Arg(Tos)-Pro-NH-Et

Man spaltet von 6 g (8,7 mMol) Z-Arg(Tos)-Pro-NH-Et die Schutzgruppe mit Bromwasserstoff in Essigsäure ab.

Nach der Umfällung aus der Lösung durch Zugabe von Äther trennt man das ausgeschiedene Hydrobromid ab und löst es sogleich in 25 ml Dimethylformamid. Die anschließende Umsetzung führt man wieder nach der obigen Methode von Mischanhydriden unter Verwendung von 3,72 g (8,7 mMol) Z-Leu DCHA, 1,2 ml (10 mMol) Pivalylchlorid, 0,83 ml (8,7 mMol) Pyridin und 1,91 ml (8,7 mMol) N-Äthylpiperidin durch; als Lösungsmittel benutzt man Dimethylformamid. Man isoliert das Produkt auf gleiche Weise wie die obige Verbindung b); so gewinnt man 4,5 g (73% der Theorie) des Produktes in Schaumform. Aminosäureanalyse: Leu 0,98, Arg 1,09, Pro 0,93.

##### d) Z-D-Tle-Leu-Arg(Tos)-Pro-NH-Et

Aus 2,6 g (5,82 mMol) Z-D-Tle DCHA setzt man Z-D-Tle mit 0,1N Schwefelsäure frei und nimmt es in Äthylacetat auf. Nach Abdampfen des Lösungsmittels gewinnt man 2 g des öligen Produktes; man löst es sogleich in 20 ml Methylenchlorid.

Man befreit 4 g (5,7 mMol) Verbindung c) von der Schutzgruppe mit Bromwasserstoff in Essigsäure. Das Produkt setzt man aus dem erhaltenen Hydrobromid an einer Anionenaustauschersäule (OH-Form) in methanolischer Lösung frei. So gewinnt man 2,9 g Leu-Arg(Tos)-Pro-NH-Et in Schaumform. Das Produkt ist elektrophoretisch einheitlich bei pH 2,5 und 5,7 (Nachweis mit Ninhydrin). Das erhaltene freie Tripeptidamid löst man sogleich in 15 ml Methylenchlorid und nach Abkühlen der Lösung auf  $-20^\circ\text{C}$  gibt man nacheinander die vorher bereitete Lösung von Z-D-Tle und einer Lösung von 2 g (9,7 mMol) Dicyclohexylcarbodiimid in 10 ml Methylenchlorid hinzu. Das Reaktionsgemisch lässt man 4 Tage lang im Kühlschrank. Danach filtriert man den ausgeschiedenen Dicyclohexylharnstoff ab, das Lösungsmittel dampft man ab und den Rückstand löst man in Äthylacetat. Man isoliert das Produkt als neutralen Stoff nach wiederholtem Auswaschen der Äthylacetatlösung nacheinander mit 1N Chlorwasserstoffsäure, 5%iger Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser. Man gewinnt 3,9 g (93% der Theorie) des Peptids in Schaumform. Das Produkt ist chromatographisch einheitlich (Dünnschichtchromatographie auf Silikagel in Chloroform-Methanol 9:1). Aminosäureanalyse: D-Tle 0,92, Leu 0,98, Arg 1,01, Pro 0,93.

##### e) Z-Ser-Tyr-D-Tle-Leu-Arg(Tos)-Pro-NH-Et

Man spaltet aus 3,6 g Verbindung d) die Schutzgruppe durch Hydrierung auf Palladium ab. So gewinnt man 3,0 g (4,4 mMol) des freien Tetrapeptids. Die Fragmentkondensation mit Z-Ser-Tyr- $\text{N}_3$  führt man in einem wasserfreien Dimethylformamid-Methylenchlorid-Gemisch bei  $-30^\circ\text{C}$  unter Verwendung von 1,9 g Z-Ser-Tyr- $\text{N}_3\text{H}_3$ , 1,5 ml 8N Chlorwasserstoff in Dioxan und 0,9 ml n-Butylnitrit durch. Zur Einstellung auf pH 8 nimmt man N-Äthylpiperidin. Man lässt das Reaktionsgemisch 3 Tage lang im Kühlschrank bei  $0^\circ\text{C}$ . Danach dampft man die flüchtigen Anteile ab, den Rückstand löst man in Äthylacetat, die Lösung wäscht man wiederholt mit 1N Chlorwasserstoffsäure, 5%iger Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser und nach dem Trocknen dampft man sie ab. Man gewinnt 4,14 g (76% der Theorie) des nichtkristallinen rohen Hexapeptids. Nach der Flüssigkeitschromatographie (Säule  $0,4 \times 25$  cm, stationäre Phase: modifiziertes Silikagel, mobile Phase: 70 Vol.-% Methanol und 30 Vol.-% Phosphatpuffer von pH 4,4) enthält das Produkt 82% des Hexapeptids. Aminosäureanalyse: Ser 1,14, Tyr 1,05, D-Tle 0,98, Leu 1,03, Arg 1,04, Pro 1,00.

f) *pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Tle-Leu-Arg(Tos)-Pro-NH-Et*

Man spaltet aus 3,8 g des vorigen Hexapeptids e) die Schutzgruppe durch Hydrierung auf Palladium in methanolischer Lösung ab. So gewinnt man 3,2 g des Stoffes mit einem Gehalt von 88% des freien Hexapeptids (Bestimmung durch Flüssigkeitschromatographie; Säule und stationäre Phase gleich wie oben, mobile Phase: 50 Vol.-% Methanol und 50 Vol.-% Trifluoressigsäure-Triäthylamin-Puffer von pH 3,9, Nachweis im Ultraviolett bei 220 nm).

Die Azidumsetzung führt man in einem wasserfreien Dimethylformamid-Dimethylsulphoxyd-Gemisch (1:1) unter Verwendung von 1,6 g *pGlu-His-Trp-N<sub>2</sub>H<sub>3</sub>*, 3,2 g des obigen Hexapeptids e) und 0,5 ml *n*-Butylnitrit durch; die Umsetzung erfolgt bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , die Azidbildung binnen 30 Min. bei gleicher Temperatur. Das Reaktionsgemisch stellt man mit Triäthylamin auf pH 8 bis 9 ein und lässt es 4 Tage lang im Kühlschrank unter zeitweiliger pH-Kontrolle. Danach dampft man die Lösungsmittel ab, den Rückstand löst man in wenig Äther und die erhaltene ölige Lösung verdünnt man mit 30 ml Methanol. Man scheidet das Produkt durch Zugabe von Äthylacetat aus, filtriert es ab und wäscht es mit einem Äthylacetat-Äther-Gemisch. So gewinnt man 3,65 g (87% der Theorie) des rohen Nonapeptidproduktes. Nach Angaben der Flüssigkeitschromatographie (Säule und stationäre Phase gleich wie oben, mobile Phase: 60 Vol.-% Methanol und 40 Vol.-% Phosphatpuffer von pH 7,0, Nachweis bei 210 nm) enthält das Rohprodukt 70% des obigen Nonapeptids, u.zw. zugleich mit gewisser Menge der Ausgangsstoffe (die Peaks identifizierte man durch Mischeinspritzungen mit den Standarden), wie es ebenso aus der Aminosäureanalyse des Rohproduktes hervorgeht: Glu 1,43, His 1,41, Trp 1,10, Ser 1,09, Tyr 1,20, D-Tle 0,89, Leu 1,00, Arg, 0,88, Pro 0,90.

Zur Bewertung der biologischen Wirksamkeit reinigt man zuerst den Stoff durch präparative Chromatographie un-

ter folgenden Bedingungen: Säule  $2,5 \times 30\text{ cm}$ , stationäre Phase: modifiziertes Silikagel (Körnung  $10\text{ }\mu\text{m}$ ), mobile Phase: 60 Vol.-% Methanol und 40 Vol.-% 0,2%iger wässriger Trifluoressigsäurelösung, Nachweis bei 210 nm. Aus 300 mg des rohen Nonapeptids (in 3 ml der mobile Phase eingespritzt) gewinnt man so 148 mg des gereinigten 98%igen Produktes; Aminosäureanalyse: Glu 1,01, His 1,01, Trp 0,90, Ser 0,95, Tyr 1,01, D-Tle 0,95, Leu 1,00, Arg 0,99, Pro 1,01.

10 g) *p-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Tle-Leu-Arg-Pro-NH-Et*

Man löst 30 mg der gereinigten Verbindung f) in 0,6 ml Trifluoressigsäure, zur erhaltenen Lösung fügt man 0,5 ml Thioglykolsäure und kühlt das Gemisch auf  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Darauf setzt man 0,4 ml Trifluormethansulphonsäure hinzu und lässt es 30 Min. im Kühlschrank. Man scheidet das Produkt durch Zugabe von Äther aus und trennt es durch Filtrierung ab. Das erhaltene mässig hygroskopische Pulver löst man in 1M Essigsäurelösung, friert die Lösung ein und trocknet sie unter vermindertem Druck. Man gewinnt so 25 mg des Rohproduktes. Dessen Reinigung erfolgt durch Flüssigkeitschromatographie an einer Säule von  $2,5 \times 30\text{ cm}$  mit modifiziertem Silikagel als der stationären Phase und einem Gemisch von 55 Vol.-% 45%igem Methanol und 45 Vol.-% 0,2%iger wässriger Trifluoressigsäurelösung als der mobilen Phase. Man löst 25 mg der Substanz in 0,5 ml der mobilen Phase, spritzt sie ein und registriert bei 280 nm. Man vereinigt die Fraktionen, die das reine Produkt enthalten, dampft das Methanol bei  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  unter vermindertem Druck ab und isoliert das Produkt durch Gefriertrocknung aus 1M Essigsäure. Die Ausbeute ist 10,5 mg des obigen Nonapeptids von 98%iger Reinheit. Aminosäureanalyse: Glu 1,03, His 0,94, Trp 0,80, Ser 0,95, Tyr 0,96, D-Tle 0,90, Leu 0,99, Arg 1,06, Pro 1,01.