



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

(19)

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

(11) **CH 652 409 A5**

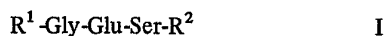
(51) Int. Cl.⁴: **C 07 K** 5/04
C 07 K 7/04
A 61 K 37/02

(12) **PATENT SCHRIFT** A5

(21) Gesuchsnummer:	1978/83	(73) Inhaber:	The George Washington University, Washington/DC (US)
(22) Anmeldungsdatum:	13.04.1983		
(30) Priorität(en):	14.05.1982 US 378463	(72) Erfinder:	Low, Teresa L. K., Annandale/VA (US) Goldstein, Allan L., Washington/DC (US)
(24) Patent erteilt:	15.11.1985		
(45) Patentschrift veröffentlicht:	15.11.1985	(74) Vertreter:	F. Hoffmann-La Roche & Co. AG, Basel

(54) **Peptide.**

(57) Peptide der Formel



worin R^1 Q, Q'-Ala-, Q'-Gln-Ala-, Q-Lys-Gln-Ala-, Q-Glu-Lys-Gln-Ala-, Q-Gln-Glu-Lys-Gln-Ala-, Q-Glu-Gln-Glu-Lys-Gln-Ala-, Q'-Ile-Glu-Gln-Glu-Lys-Gln-Ala-, Q-Thr-Ile-Glu-Gln-Glu-Lys-Gln-Ala, Q-Glu-Thr-Ile-Glu-Gln-Glu-Lys-Gln-Ala- oder Q-Gln-Sar darstellt; Q Wasserstoff oder Acyl ist; Q' Wasserstoff oder Acyl ist, aber Acyl, sofern R^2 Hydroxy bedeutet; R^2 Hydroxy, -A-C oder -A-B-C; A Asp oder Asn; B Glu-Ile-Thr und C Ala-Lys-Thr-OH darstellen und deren pharmazeutisch verträgliche Additionssalze mit Säuren oder Basen. Die Peptide können als pharmazeutische Mittel verwendet werden, die die Produktion von TdT-positiven Prothymocyten stimulieren, die Macrophagen-Wanderung hemmen oder die Immunantwort Steroid-supprimierter Säuger wiederherstellen.

PATENTANSPRÜCHE

1. Peptide der Formel



worin R^1 Q, Q'-Ala-, Q'-GLN-Ala-, Q-Lys-Gln-Ala-, Q-Glu-Lys-Gln-Ala-, Q-Gln-Glu-Lys-Gln-Ala-, Q'-Ile-Glu-Gln-Glu-Lys-Gln-Ala-, Q-Thr-Ile-Glu-Gln-Glu-Lys-Gln-Ala-, Q-Glu-Thr-Ile-Glu-Gln-Glu-Lys-Gln-Ala- oder Q-Gln-Sar- darstellt; Q Wasserstoff oder Acyl ist; Q' Wasserstoff oder Acyl ist, aber Acyl, sofern R^2 Hydroxy bedeutet; R^2 Hydroxy, -A-C oder -A-B-C; A Asp oder Asn; B Glu-Ile-Thr und C Ala-Lys-Thr-OH darstellen und deren pharmazeutisch verträgliche Additionssalze mit Säuren oder Basen.

2. Ein Peptid gemäß Anspruch 1 der Formel H-Glu-Thr-Ile-Glu-Gln-Glu-Lys-Gln-Ala-Gly-Glu-Ser-OH.

3. Ein Peptid gemäß Anspruch 1 der Formel H-Gln-Glu-Lys-Gln-Ala-Gly-Glu-Ser-OH.

4. Ein Peptid gemäß Anspruch 1 der Formel H-Gly-Glu-Ser-OH.

5. Ein Peptid gemäß Anspruch 1 der Formel H-Gln-Ala-Gly-Glu-Ser-Asp-Ala-Lys-Thr-OH.

6. Ein Peptid gemäß Anspruch 1 der Formel H-Gln-Ala-Gly-Glu-Ser-Ala-Lys-Thr-OH.

7. Ein Peptid gemäß Anspruch 1 der Formel $H_3C\text{-CO-Gln-Sar-Gly-Glu-Ser-Asp-Ala-Lys-Thr-OH}$.

8. Ein Peptid gemäß Anspruch 1 der Formel $H_3C\text{-CO-Gln-Sar-Gly-Glu-Ser-Asn-Ala-Lys-Thr-OH}$.

9. Ein Peptid gemäß Anspruch 1 der Formel H-Gln-Ala-Gly-Glu-Ser-Asp-Glu-Ile-Thr-Ala-Lys-Thr-OH.

10. Peptide gemäß einem der Ansprüche 1-9 als pharmazeutisch aktive Verbindungen.

11. Peptide gemäß einem der Ansprüche 1-9 als Mittel, die die Differenzierung und Funktion von T-Zellen regulieren.

12. Peptide gemäß einem der Ansprüche 1-9 als Mittel, die die Produktion von TdT-positiven Prothymocyten stimulieren, die Macrophagen-Wanderung hemmen oder die Immun-Antwort Steroid-supprimierter Säuger wiederherstellen.

13. Pharmazeutische Kompositionen, enthaltend ein Peptid gemäß einem der Ansprüche 1-9 und einen verträglichen Träger.

14. Die Verwendung eines Peptids gemäß einem der Ansprüche 1-9 zur Herstellung pharmazeutischer Kompositionen gemäß Anspruch 13.

In den letzten Jahren wurden verschiedene Peptide, die in der Thymusdrüse vorkommen, mit der Entwicklung und Aufrechterhaltung der immunologischen Kompetenz bei Mensch und Tier in Verbindung gebracht. Die Bedeutung des Immunsystems bei der Abwehr von Krebs- und Tumor-Zellen ist heutzutage weitgehend anerkannt. In den vergangenen Jahren wurden einige Polypeptide, von denen gezeigt werden konnte, dass sie die Reifung, Differenzierung und Funktion von T-Zellen stimulieren, aus Rinder-Thymus isoliert. Unter ihnen wurde das saure Peptid Thymosin α_1 besonders intensiv untersucht. Seine Struktur und Aktivität ist beispielsweise in U.S.P. 4079127 beschrieben.

Darüber hinaus beschrieben Goldstein et al. (J. of Reticuloendothelial Society 23, 253 [1978]) teilweise gereinigtes Thymosin β_3 und β_4 als Bestandteile der teilweise gereinigten Thymosinfraktion 5. Low und Goldstein haben gezeigt (Year in Hematology 1978, Siber et al. ed. [Plenum Publ. Co. 1978], S. 281), dass teilweise gereinigtes Thymosin β_3 und β_4 TdT-positive (TdT = terminale Deoxynucleotidyltransferase) Zellen in T-Zell-Populationen anregen. Es ist ferner berichtet worden, dass Thymosin

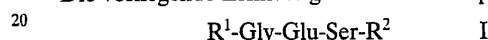
β_3 und β_4 das Wiederauftreten von TdT-positiven Zellen im Thymus nach Steroidinduzierter Immunsuppression beschleunigen (Low et al., PNAS 78, 1162 [1981]; Hu et al., Mol. Cell. Biochem. 41, 49 [1981]) und die Wanderung von Macrophagen hemmen (Thurman et al., Lymphokines and Thymic Hormones: Their Potential Utilization in Cancer Therapeutics, Goldstein & Chirigos [Herausg.], Raven Press, 1981, S. 145).

Bei der Synthese von Thymosin α_1 in flüssiger Phase verwendete Wang die geschützten Carboxyl-endständigen Octa-,

10 Undeca- und Tetradecapeptide von Thymosin α_1 als Zwischenprodukte. Diese Verbindungen wurden durch Hydrogenolyse und anschließende Behandlung mit HF in die freie Form übergeführt und als aktiv in der Regulierung und Differenzierung von T-Zellen beschrieben (U.S.P. 4148788).

15 Schliesslich wurden die Peptide H-Ala-Gly-Glu-Ser-OH, H-Gln-Ala-Gly-Glu-Ser-OH und H-Ile-Glu-Gln-Glu-Lys-Gln-Ala-Gly-Glu-Ser-OH durch Abbau von Thymosin β_4 mit Trypsin und Thermolysin erhalten (Low et al., PNAS 78, 1162 [1981]).

Die vorliegende Erfindung betrifft neue Peptide der Formel



worin R^1 Q, Q'-Ala-, Q'-Gln-Ala-, Q-Lys-Gln-Ala-, Q-Glu-Lys-Gln-Ala-, Q-Gln-Glu-Lys-Gln-Ala-, Q'-Ile-Glu-Gln-Glu-Lys-Gln-Ala-, Q-Thr-Ile-Glu-Gln-Glu-Lys-Gln-Ala-, Q-Glu-Thr-Ile-Glu-Gln-Glu-Lys-Gln-Ala- oder Q-Gln-Sar- darstellt; Q Wasserstoff oder Acyl ist; Q' Wasserstoff oder Acyl ist, aber Acyl, sofern R^2 Hydroxy bedeutet; R^2 Hydroxy, -A-C oder -A-B-C; A Asp oder Asn; B Glu-Ile-Thr und C Ala-Lys-Thr-OH darstellen und deren pharmazeutisch

30 verträgliche Additionssalze mit Säuren oder Basen.

Die Formel I umfasst Peptide mit den folgenden Aminosäuresequenzen:

H-Glu-Thr-Ile-Glu-Gln-Glu-Lys-Gln-Ala-Gly-Glu-Ser-OH	II
H-Thr-Ile-Glu-Gln-Glu-Lys-Gln-Ala-Gly-Glu-Ser-OH	III
35 H-Glu-Gln-Glu-Lys-Gln-Ala-Gly-Glu-Ser-OH	IV
H-Gln-Glu-Lys-Gln-Ala-Gly-Glu-Ser-OH	V
H-Glu-Lys-Gln-Ala-Gly-Glu-Ser-OH	VI
H-Lys-Gln-Ala-Gly-Glu-Ser-OH	VII
H-Gly-Glu-Ser-OH	VIII
40 H-Gln-Ala-Gly-Glu-Ser-Asp-Ala-Lys-Thr-OH	IX
H-Gln-Ala-Gly-Glu-Ser-Asn-Ala-Lys-Thr-OH	X
$H_3C\text{-CO-Gln-Sar-Gly-Glu-Ser-Asp-Ala-Lys-Thr-OH}$	XI
$H_3C\text{-CO-Gln-Sar-Gly-Glu-Ser-Asn-Ala-Lys-Thr-OH}$	XII
45 H-Gln-Ala-Gly-Glu-Ser-Asp-Glu-Ile-Thr-Ala-Lys-Thr-OH	XIII

Die erfindungsgemässen Peptide können verwendet werden zur Stimulation der Produktion TdT-positiver Prothymocyten.

Der Ausdruck «Acyl», der im Zusammenhang mit der Definition des Substituenten R^1 verwendet wurde, bezieht sich auf

50 Reste von bekannten aliphatischen Säuren mit 1-7 Kohlenstoffatomen, vorzugsweise auf Acetyl.

Die Verbindungen der Formel I können in an sich bekannter Weise, d. h. in flüssiger Phase oder nach der Festphasen-

55 Methode, hergestellt werden.

Nach der Flüssigphasen-Methode können die Verbindungen der Formel I entweder durch sukzessiven Aufbau der Aminosäureketten erhalten werden oder durch ein Verfahren, bei dem zunächst bestimmte Peptidfragmente synthetisiert werden, die dann zu dem gewünschten Peptid zusammengefügt werden. Der

60 konventionell letzte Schritt bei dieser Methode besteht in der Abspaltung der Schutzgruppen des geschützten Peptids.

Die Festphasen-Synthese wird in an sich bekannter Weise durchgeführt, beispielsweise wie von Merrifield oder Barany et al. beschrieben (J. Am. Chem. Soc. 85, 2149-2154 [1963]; The

65 Peptides, Analysis, Synthesis and Biology, Vol. 2, 1-284 [1980]).

In einer bevorzugten Ausführungsform werden die Verbindungen II-VIII nach der Festphasen-Synthese hergestellt. Kommerziell erhältliches Chlormethylpolystyrolharz wird mit N^a -

Boc-O-Benzyl-L-serin in Gegenwart von Dicyclohexyl-Carbodimid (DCC) acyliert zu N^α-Boc-O-Benzyl-L-seryl-Harz. Das acylierte Harz wird in das Reaktionsgefäß einer nach der Festphasen-Synthese automatisch arbeitenden Apparatur gegeben. Diese wird dann so programmiert, dass die folgenden geschützten Aminosäuren in der angegebenen Reihenfolge eingesetzt werden:

- | | |
|-----------------------|---|
| (1) Boc-Glu(OBzl)-OH | |
| (2) Boc-Gly-OH | (Stop für Synthese des Tripeptids VIII) |
| (3) Boc-Ala-OH | |
| (4) Boc-Gln-ONp | |
| (5) Boc-Lys(Z)-OH | (Stop für Synthese des Hexapeptids VII) |
| (6) Boc-Glu(OBzl)-OH | (Stop für Synthese des Heptapeptids VI) |
| (7) Boc-Gln-ONp | (Stop für Synthese des Octapeptids V) |
| (8) Boc-Glu(OBzl)-OH | (Stop für Synthese des Nonapeptids IV) |
| (9) Boc-Ile-OH | |
| (10) Boc-Thr(Bzl)-OH | (Stop für Synthese des Undecapeptids III) |
| (11) Boc-Glu(OBzl)-OH | (Stop für Synthese des Dodecapeptids II) |

Boc bedeutet t-Butyloxycarbonyl, OBzl bedeutet die Benzylestergruppe, ONp bedeutet die p-Nitrophenylestergruppe und Z bedeutet Benzyloxycarbonyl.

Statt der vorstehend angegebenen geschützten Aminosäuren können auch äquivalente Verbindungen eingesetzt werden. So kann z. B. Boc-Gln-ONp (Stufen 4 und 7) und Boc-Lys(Z)-OH (Stufe 5) ersetzt werden durch Boc-Gln-OH und Boc-Lys(2-ClZ)-OH, nach einem Verfahren, das dem von Wang et al., Int. J. Peptide Protein Res. 18, 413–415 (1981), beschrieben analog ist.

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform werden die Verbindungen IX–XIII nach der Festphasenmethode hergestellt, wobei kommerziell erhältliches Chlormethylpolystyrolharz mit N^α-Boc-O-Benzyl-L-threonin in Gegenwart von DCC zu N^α-Boc-O-benzyl-L-threonyl-Harz acyliert wird. Das acylierte Harz wird in das Reaktionsgefäß eines nach der Festphasensynthese automatisch arbeitenden Apparates gegeben. Der Apparat wird dann so programmiert, dass die in den folgenden Kolonnen A–E angegebenen geschützten Aminosäuren sukzessive eingesetzt werden:

- | | |
|------------------------------|-------------------------------|
| A. Nonapeptid der Formel IX: | B. Nonapeptid der Formel X: |
| Boc-Lys(Z)-OH | Boc-Lys(Z)-OH |
| Boc-Ala-OH | Boc-Ala-OH |
| Boc-Asp(OBzl)-OH | Boc-Asn-ONp |
| Boc-Ser(Bzl)-OH | Boc-Ser(Bzl)-OH |
| Boc-Glu(OBzl)-OH | Boc-Glu(OBzl)-OH |
| Boc-Gly-OH | Boc-Gly-OH |
| Boc-Ala-OH | Boc-Ala-OH |
| Boc-Gln-ONp | Boc-Gln-ONp |
| C. Nonapeptid der Formel XI: | D. Nonapeptid der Formel XII: |
| Boc-Lys(Z)-OH | Boc-Lys(Z)-OH |
| Boc-Ala-OH | Boc-Ala-OH |
| Boc-Asp(OBzl)-OH | Boc-Asn-ONp |
| Boc-Ser(Bzl)-OH | Boc-Ser(Bzl)-OH |
| Boc-Glu(OBzl)-OH | Boc-Glu(OBzl)-OH |
| Boc-Gly-OH | Boc-Gly-OH |
| Boc-Sar-OH | Boc-Sar-OH |
| H ₃ C-CO-Gln-ONp | H ₃ C-Co-Glu-ONp |

E. Dodecapeptid der Formel XIII:

- | | |
|------------------|--|
| Boc-Lys(Z)-OH | |
| Boc-Ala-OH | |
| Boc-Thr(Bzl)-OH | |
| Boc-Ile-OH | |
| Boc-Glu(OBzl)-OH | |
| Boc-Asp(OBzl)-OH | |
| Boc-Ser(Bzl)-OH | |
| Boc-Glu(OBzl)-OH | |
| Boc-Gly-OH | |
| Boc-Ala-OH | |
| Boc-Gln-ONp | |

In jeden Kupplungsschritt (120 min) kann ein vierfacher Überschuss an Boc-Aminosäure und DCC eingesetzt werden. Die Abspaltung der BOC-Schutzgruppe erfolgt durch 30-minütige Behandlung mit 33%iger Trifluoressigsäure in Methylenchlorid. Die Abspaltung der geschützten Peptide vom Harz unter gleichzeitiger Abspaltung der Schutzgruppe erfolgt durch Behandlung mit wasserfreiem HF-Anisol. Die rohen Peptide werden über eine Sephadex-G-10-Säule gegeben und dann durch Säulenchromatographie, beispielsweise an DEAE-Sephadex A-25, gereinigt.

Werden die erfindungsgemässen Peptide in flüssiger Phase synthetisiert, so können hierbei die üblichen Schutzgruppen verwendet werden: für Carboxyl- und Hydroxy-Gruppen beispielsweise Aryl-Gruppen, insbesondere Phenyl oder durch nieder-Alkyl, Halogen, Nitro, Mercapto oder Thiogruppen, wie C₁₋₇-Alkylthio, substituiertes Phenyl; für Amino-Gruppen beispielsweise Butyloxycarbonyl (Boc) oder Benzyloxycarbonyl (Z).

Die Verbindungen der Formel I der vorliegenden Erfindung sind aktiv im Hinblick auf die Regulierung, Differenzierung und Funktion der T-Zellen. Sie sind Inducer für die nicht-Matrizenabhängige DNA Polymerase, die als terminale Deoxynucleotidyl-Transferase (TdT) bekannt ist. Schliesslich sind sie Glucocorticoid-Antagonisten, die in vivo z. B. dem Hydrocortisonacetat (HCA) entgegenwirken. Sie wirken auf das Thymus- und Immunsystem, indem sie die Rekonstitution von Thymozytenpopulationen innerhalb der Thymusdrüse und von TdT-positiven Thymocyten beschleunigen. Die Verbindungen der Formel I können ferner in nicht-spezifischer Weise die Macrophagen-Wanderung in Abwesenheit spezifischer Antigene hemmen, was in vitro im MIF-Assay nachgewiesen werden kann. Schliesslich können die Verbindungen der Formel I die Immunantwort in Steroid-supprimierten Säugern wiederherstellen.

Biologische Aktivität:

Teil A

Die in-vivo-Wirkung von Thymosin β₃, Thymosin β₄, Thymosin-Fraktion 5, Verbindung V (β₄-C8-Fragment) und Verbindung XIII (β₃-C12-Fragment) auf die Thymocyten-TdT-Aktivität in mit Hydrocortisonacetat (HCA) behandelten C57BL/6J Mäusen wurde nach der Methode von Hu et al. (Fed. Proc. 38, 1079 [1979]; Mol. Cell. Biochem 41, 49 [1981]) bestimmt. Eine 1,25 mg HCA-Injektion pro Tier wurde am Tage null (0) verabreicht. Auf jede Injektion folgte während 11 Tagen eine tägliche Behandlung des Tieres mit den zu untersuchenden Verbindungen und Kontrollen (d. h. kein HCA bzw. HCA-Kochsalzlösung). Es wurde der Anstieg der TdT-spezifischen Aktivität (nMol aufgenommenes dGTP pro 10⁸ Thymocyten pro Stunde) gegenüber der von mit HCA-Kochsalzlösung behandelten Tieren bestimmt. Die Ergebnisse sind in den Spalten 3 und 4 der Tabelle 1 zusammengefasst.

Teil B

Die in-vivo-Wirkung von Thymosin β_3 , Thymosin β_4 Thymosin-Fraktion 5, Verbindung V und Verbindung XIII auf die Wiederherstellung der Milz-Mitogen-Antwort in HCA-supprimierten C57BL/6J-Mäusen wurde nach der von Thurman und Goldstein in «The Biological Activity of Thymic Hormones», D. W. von Bekkum (Herausg.), Kooyker Scientific Publications, Rotterdam, S. 261 (1975) beschriebenen Methode bestimmt.

Die Ergebnisse sind in Spalten 5 und 6 der Tabelle 1 wiedergegeben.

Der standardisierte MIF-Assay wurde nach der Methode von Thurman et al., Lymphokines and Thymic Hormones: Their Potential Utilization in Cancer Therapeutics, Goldstein und Chirigos (Herausg.), Raven Press, New York, Seiten 145–157 (1981), für natürliches Thymosin β_4 , synthetisches Thymosin β_4 , Verbindung XIII (β_3 -C12-Fragment), Verbindung V (β_4 -C8-Fragment), Verbindung VII (β_4 -C6-Fragment) und das bekannte β_4 -C10-Fragment durchgeführt. Die Werte für die prozentuale unspezifische Hemmung (PNSI) wurden berechnet und in Tabelle 2 zusammengestellt.

Tabelle 1

In-vivo-Effekte von Thymosin β_3 , Thymosin β_4 , Thymosin-Fraktion 5, Verbindung V und Verbindung XIII auf die Thymocyten-TdT-Aktivität und auf die Wiederherstellung der Milz-Mitogen-Antwort in HCA-supprimierten C57BL/6J-Mäusen.

Behandlung*	Menge	TdT-Aktivität		Mitogen-Antwort	
		Spez. Akt	Zunahme[%]	ConA[cpm]	PHA-P[cpm]
Kontrolle (kein HCA)	–	8,9	–	210,000	30,000
Kontrolle (HCA-NaCl-Lsg.)	–	6,4	–	86,000	12,000
Thymosin-Fraktion 5	100 μ g	10,0	+57	175,000	35,000
Thymosin β_4	1 μ g	8,8	+38	125,000	10,000
Verbindung XIII	10 μ g	7,6	+19	140,000	11,000
Thymosin β_3	1 μ g	9,7	+52	120,000	27,000
Verbindung V	10 μ g	8,2	+28	110,000	65,000

*) 6–8 Mäuse/Gruppe

Tabelle 2

Effekt von Thymosin β_4 und synthetischen Carboxyl-endständigen β_3 - und β_4 -Fragmenten auf die Hemmung der Macrophagen-Wanderung.

Thymosin-Verbindung	Konzentration (nMol/ml)	PNSI
Natürl. Thymosin β_4	0,5	37,6
	0,05	29,2
	0,005	23,1
Synthet. Thymosin β_4	0,5	30,3
	0,05	25,9
	0,005	25,0
β_3 -C12-Fragment (XIII)	0,5	30,2
	0,05	29,7
	0,005	24,7
β_4 -C8-Fragment (V)	0,0005	23,5
	0,5	24,1
	0,05	25,4
β_4 -C10-Fragment	0,005	27,0
	0,0005	5,5
	0,5	21,6
β_4 -C6-Fragment (VII)	0,05	18,8
	0,005	10,7
	0,0005	– 5,3
	0,5	18,3
	0,05	15,2
	0,005	– 5,1
	0,0005	3,1

Die Verbindungen der Formel I können warmblütigen Säugern parenteral verabreicht werden, und zwar entweder intravenös, subcutan oder intramuskulär. Diese Verbindungen sind wirksame Immunpotentiatoren bei einer täglichen Dosierung im Bereich von etwa 0,1 bis 50 mg/kg Körpergewicht bei intravenöser Verabreichung. Selbstverständlich hängt aber die notwendige

Dosierung von der speziellen Krankheit, die behandelt werden soll, ihrer Schwere sowie der Dauer der Behandlung ab. Eine geeignete pharmazeutische Dosierungseinheit besteht aus 1–5 mg einer lyophilisierten Verbindung der Formel I, die vor der Anwendung durch Zusatz von sterilem Wasser oder steriler Kochsalzlösung rekonstituiert wird.

Die erfindungsgemässen Verbindungen umfassen auch pharmazeutisch verträgliche Salze der Verbindungen der Formel I. Geeignete Salze sind beispielsweise die Kalium- und Natriumsalze oder Salze mit einer starken organischen Base wie Guanidin. Ausserdem können als Gegenionen zu diesen Kationen, z. B. Chlorid, Bromid, Sulfat, Phosphat, Malat, Ascorbat usw., in den Präparaten vorliegen.

Die Herstellung der erfindungsgemässen Verbindungen wird durch die folgenden Beispiele illustriert.

Beispiel 1

Eine Lösung von 3,511 g (11,9 mMol) N^α-Boc-O-Benzyl-L-serin in 1,50 ml (10,8 mMol) Triethylamin und 25 ml absolutem Ethanol wurde mit 10,0 g (11,9 mMol) chlormethyliertem Copolystyrol-1 % Divinylbenzol (1,19 mMol Cl/g Harz) umgesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde unter Rückfluss 48 h gerührt, filtriert, dreimal mit jeweils Ethanol, Wasser, Methanol und CH₂Cl₂ gewaschen und im Vakuum getrocknet. Durchführung der unten angegebenen Reaktionsschritte (a)–(d) lieferte TFA-H-Ser(Bzl)-O-Harz.

10,0 g (2,71 mMol) dieses Harzes wurden nacheinander gekuppelt mit Boc-Glu(OBzl)-OH (3,65 g, 10,84 mMol, 4 Äquiv.) und Boc-Gly-OH (2,05 g, 10,84 mMol, 4 Äquiv.) zu dem Tripeptidyl-Harz.

Während eines Kupplungs-Zyklus wird das acylierte Harz nacheinander umgesetzt mit (a) Methylenchlorid (dreimal 5 min); (b) 33%ige Trifluoressigsäure-Methylenchlorid (2 min); (c) 33%ige Trifluoressigsäure-Methylenchlorid (30 min); (d) Methylenchlorid (dreimal 5 min); (e) 5 % Diisopropylethylamin-Methylenchlorid (2 min); (f) 5 % Diisopropylethylamin-Methylenchlorid (10 min); (g) Methylenchlorid (dreimal 5 min); (h) DMF (dreimal 5 min); (i) Methylenchlorid (dreimal 5 min);

(j) der geschützten Aminosäure (10 min); (k) DCC (2 h); (1) Methylenchlorid (dreimal 5 min); (m) Isopropanol (dreimal 5 min) und (n) DMF (dreimal 5 min).

1,0 g (0,271 mMol) des Tripeptidyl-Harzes wurde während 45 min mit HF (ca. 10 ml), enthaltend Anisol (1,5 ml), bei 0°C behandelt. Das HF wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mit Ether gewaschen, in 0,1M Essigsäure extrahiert und lyophilisiert. Es wurde Glycyl-L-glutamyl-L-serin (VIII) in Form eines weissen Feststoffes erhalten.

Beispiel 2

2,439 mMol des Tripeptidyl-Harzes von Beispiel 1 wurden nacheinander mit jeweils 4 Äquivalenten Boc-Ala-OH (1,85 g, 9,76 mMol), Boc-Gln-ONp in 25 ml DMF (24 h; unter Auslassung des Schrittes (k) des Kupplungs-Zyklus') und N-Boc-N^α-Z-L-Lys-OH zu dem Hexapeptidyl-Harz umgesetzt.

1,0 g des Hexapeptidyl-Harzes wurde 45 min mit HF (ca. 10 ml), enthaltend Anisol (1,5 ml), bei 0°C umgesetzt. Das HF wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mit Ether gewaschen, in 0,1M Essigsäure extrahiert und lyophilisiert. Es wurde L-Lysyl-L-glutamyl-L-alanyl-glycyl-L-glutamyl-L-serin (VII) in Form eines weissen Feststoffes erhalten.

Beispiel 3

1,626 mMol des Hexapeptidyl-Harzes aus Beispiel 2 wurden mit Boc-Glu(OBzl)-OH (2,92 g, 8,67 mMol, 4 Äquiv.) zum Heptapeptidyl-Harz gekoppelt.

1,0 g dieses Harzes wurden 45 min mit HF (ca. 10 ml), enthaltend Anisol (1,5 ml), bei 0°C behandelt. Das HF wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mit Ether gewaschen, in 0,1M Essigsäure extrahiert und lyophilisiert. Es wurde L-Glutamyl-L-lysyl-L-glutamyl-L-alanyl-glycyl-L-glutamyl-L-serin (VI) in Form eines weissen Feststoffes erhalten.

Beispiel 4

1,355 mMol des Heptapeptidyl-Harzes aus Beispiel 3 wurden mit Boc-Gln-ONp (1,99 g, 5,42 mMol, 4 Äquiv.; unter Auslassung des Schrittes (k) des Kupplungs-Zyklus') in 25 ml DMF während 24 h zu dem entsprechenden Octapeptidyl-Harz gekoppelt.

1,0 g dieses Harzes wurde während 45 min mit HF (ca. 10 ml), enthaltend Anisol (1,5 ml), bei 0°C behandelt. Das HF wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rest mit Ether gewaschen, in 0,1M Essigsäure extrahiert und lyophilisiert. Es wurde L-Glutamyl-L-glutamyl-L-lysyl-L-glutamyl-L-alanyl-glycyl-L-glutamyl-L-serin (V) in Form eines weissen Feststoffes erhalten.

Beispiel 5

1,084 mMol des Octapeptidyl-Harzes aus Beispiel 4 wurden mit Boc-Glu(OBzl)-OH (1,46 g, 4,336 mMol, 4 Äquiv.) zu dem entsprechenden Nonapeptidyl-Harz gekoppelt.

1,0 g des Nonapeptidyl-Harzes wurde während 45 min mit HF (ca. 10 ml), enthaltend Anisol (1,5 ml), bei 0°C behandelt. Das HF wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand mit Wasser gewaschen, in 0,1M Essigsäure extrahiert und lyophilisiert. Es wurde L-Glutamyl-L-glutamyl-L-glutamyl-L-lysyl-L-glutamyl-L-alanyl-glycyl-L-glutamyl-L-serin (IV) in Form eines weissen Feststoffes erhalten.

Beispiel 6

0,813 mMol des Nonapeptidyl-Harzes aus Beispiel 5 wurde nacheinander mit jeweils 4 Äquiv. von Boc-Ile-OH und Boc-Thr(Bzl)-OH zum entsprechenden Undecapeptidyl-Harz gekoppelt.

1,0 g des Undecapeptidyl-Harzes wurde während 45 min mit HF (ca. 10 ml), enthaltend Anisol (1,5 ml), bei 0°C behandelt.

Das HF wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand mit Ether gewaschen, in 0,1M Essigsäure extrahiert und lyophilisiert. Es wurde L-Threonyl-L-isoleucyl-L-glutamyl-L-glutamyl-L-lysyl-L-glutamyl-L-alanyl-glycyl-L-glutamyl-L-serin (III) in Form eines weissen Feststoffes erhalten.

Beispiel 7

0,271 mMol des Undecapeptidyl-Harzes aus Beispiel 6 wurden mit Boc-Glu(OBzl)-OH (365 mg, 1,084 mMol, 4 Äquiv.) zu dem entsprechenden Dodecapeptidyl-Harz gekoppelt. Das erhaltene Produkt wurde während 45 min mit HF (ca. 10 ml), enthaltend Anisol (1,5 ml), bei 0°C behandelt. Das HF wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand mit Ether gewaschen, in 0,1 ml Essigsäure extrahiert und lyophilisiert. Es wurde L-Glutamyl-L-threonyl-L-isoleucyl-L-glutamyl-L-glutamyl-L-lysyl-L-glutamyl-L-alanyl-glycyl-L-glutamyl-L-serin (II) in Form eines weissen Feststoffes erhalten.

Beispiel 8

Eine Lösung von 3,678 g (11,9 mMol) N^α-Boc-O-Benzyl-L-threonin in 1,50 ml (10,7 mMol) Triethylamin und 25 ml absolutem Ethanol wurde mit 10,0 g (11,9 mMol) chlormethyliertem Copolystyrol-1 % Divinylbenzol (1,19 mMol Cl/g Harz) umgesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde wie in Beispiel 1 beschrieben aufgearbeitet.

Die Festphasen-Synthese wurde wie in Beispiel 1 beschrieben ausgeführt. 10,0 g TFA·H-Thr(Bzl)-O-Harz (3,12 mMol) wurden nacheinander mit Boc-Lys(Z)-OH (4,742 g, 12,48 mMol, 4 Äquiv.) und Boc-Ala-OH (2,360 g, 12,48 mMol, 4 Äquiv.) zum entsprechenden Tripeptidyl-Harz umgesetzt.

1,0 g (0,312 mMol) des Tripeptidyl-Harzes wurde dann nacheinander gekoppelt mit Boc-Asp(OBzl)-OH (4,03 mg, 1,248 mMol, 4 Äquiv.), Boc-Ser(Bzl)-OH (368 mg, 1,248 mMol, 4 Äquiv.), Boc-Glu(OBzl)-OH (421 mg, 1,248 mMol, 4 Äquiv.), Boc-Gly-OH (218 mg, 1,248 mMol, 4 Äquiv.) und Boc-Ala-OH (236 mg, 1,248 mMol, 4 Äquiv.). Ein abschliessender Kupplungs-Zyklus mit Boc-Gln-ONp (458 mg, 1,248 mMol, 4 Äquiv.) in 25 ml DMF (24 h) unter Auslassung des Schrittes (k) lieferte das entsprechende Nonapeptidyl-Harz. Das erhaltene Produkt wurde während 45 min mit HF (ca. 10 ml), enthaltend Anisol (1,72 ml), bei 0°C behandelt. Das HF wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mit Ether gewaschen, in 0,1M Essigsäure extrahiert und lyophilisiert. Es wurde L-Glutamyl-L-alanyl-glycyl-L-glutamyl-L-seryl-L-aspartyl-L-alanyl-L-lysyl-L-threonin (IX) in Form eines weissen Feststoffes erhalten.

Beispiel 9

1,0 g (0,312 mMol) des Tripeptidyl-Harzes aus Beispiel 8 wurde in Stufe (j) mit 441 mg Boc-Asn-ONp (1,248 mMol, 4 Äquiv.) in 25 ml DMF (24 h) gekoppelt, wobei Stufe (k) des Kupplungs-Zyklus' ausgelassen wurde. Anschliessend wurde jeweils mit 4 Äquiv. Boc-Ser(Bzl)-OH (368 mg), Boc-Glu(OBzl)-OH (218 mg), Boc-Gly-OH (218 mg) und Boc-Ala-OH (236 mg) gekoppelt. Ein abschliessender Kupplungs-Zyklus, in dem die Stufe (k) ausgelassen wurde, mit Boc-Gln-ONp (458 mg, 1,248 mMol, 4 Äquiv.) in 25 ml DMF (24 h) lieferte das entsprechende Nonapeptidyl-Harz. Das Reaktionsprodukt wurde während 45 min mit HF (210 ml), enthaltend Anisol (1,72 ml), bei 0°C behandelt. Das HF wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mit Ether gewaschen, in 0,1M Essigsäure extrahiert und lyophilisiert. Es wurde L-Glutamyl-L-alanyl-glycyl-L-glutamyl-L-seryl-L-asparagyl-L-alanyl-L-lysyl-L-threonin (X) in Form eines weissen Feststoffes erhalten.

Beispiel 10

1,0 g (0,312 mMol) des Tripeptidyl-Harzes aus Beispiel 8 wurde nacheinander mit jeweils 4 Äquiv. Boc-Asp(OBzl)-OH

(403 mg), Boc-Ser(Bzl)-OH (368 mg), Boc-Glu(OBzl)-OH (421 mg), Boc-Gly-OH (218 mg) und Boc-Sar-OH (236 mg) gekuppelt. In einem letzten Kupplungs-Zyklus, in dem die Stufe (k) ausgelassen wurde, mit Acetyl-Gln-ONp (386 mg, 1,247 mMol, 4 Äquiv.) in 25 ml DMF (24 h) wurde das entsprechende Nonapeptidyl-Harz erhalten. Das Reaktionsprodukt wurde während 45 min mit HF (ca. 10 ml), enthaltend Anisol (1,72 ml), bei 0°C behandelt. Das HF wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand mit Ether gewaschen, in 0,1M Essigsäure extrahiert und lyophilisiert. Es wurde N-Acetyl-L-glutaminylsarcosyl-glycyl-L-glutamyl-L-seryl-L-asparaginyll-alanyl-L-lysyl-L-threonin (XI) in Form eines weissen Feststoffes erhalten.

Beispiel 11

1,0 g (0,312 mMol) des Tripeptidyl-Harzes von Beispiel 8 wurde in Stufe (j) mit Boc-Asn-ONp (441 mg, 1,248 mMol, 4 Äquiv.) in 25 ml DMF (24 h) gekuppelt, wobei Schritt (k) des Kupplungs-Zyklus ausgelassen wurde. Anschliessend wurde mit jeweils 4 Äquiv. Boc-Ser(Bzl)-OH (368 mg), Boc-Glu(OBzl)-OH (421 mg), Boc-Gly-OH (218 mg) und Boc-Sar-OH (236 mg) gekuppelt. Ein abschliessender Kupplungs-Zyklus, in dem Stufe (k) ausgelassen wurde, mit Acetyl-Gln-ONp (386 mg, 1,248 mMol, 4 Äquiv.) in 25 ml DMF (24 h) lieferte das entsprechende Nonapeptidyl-Harz. Das Reaktionsprodukt wurde wäh-

rend 45 min mit HF (ca. 10 ml), enthaltend Anisol (1,72 ml), bei 0°C behandelt. Das HF wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mit Ether gewaschen, in 0,1M Essigsäure extrahiert und lyophilisiert. Es wurde N-Acetyl-L-glutaminylsarcosyl-glycyl-L-glutamyl-L-seryl-L-asparaginyll-alanyl-L-lysyl-L-threonin (XII) in Form eines weissen Feststoffes erhalten.

Beispiel 12

10 1,0 g (0,312 mMol) des Tripeptidyl-Harzes aus Beispiel 8 wurde mit jeweils 4 Äquiv. Boc-Thr(Bzl)-OH (386 mg), Boc-Ile-OH (289 mg), Boc-Glu(OBzl)-OH (421 mg), Boc-Asp(OBzl)-OH (403 mg), Boc-Ser(Bzl)-OH (368 mg), Boc-Glu(OBzl)-OH (421 mg), Boc-Gly-OH (218 mg), und Boc-Ala-OH (236 mg) gekuppelt. Ein abschliessender Kupplungs-Zyklus, in dem Schritt (k) ausgelassen wurde, mit Boc-Gln-ONp (458 mg, 1,248 mMol, 4 Äquiv.) in 25 ml DMF (24 h) lieferte das entsprechende Dodecapeptidyl-Harz. Das Reaktionsprodukt wurde während 45 min mit HF (ca. 10 ml), enthaltend Anisol (1,72 ml), bei 0°C behandelt. Das HF wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand mit Ether gewaschen, in 0,1M Essigsäure extrahiert und lyophilisiert. Es wurde L-Glutaminyll-alanyl-glycyl-L-glutamyl-L-seryl-L-aspartyl-L-glutamyl-L-isoleucyl-L-threonyll-alanyl-L-lysyl-L-threonin (XIII) in Form eines weissen Feststoffes erhalten.