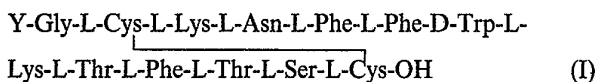




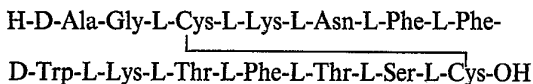
## PATENTANSPRÜCHE

## 1. Therapeutisch wirksame Verbindungen der Formel I



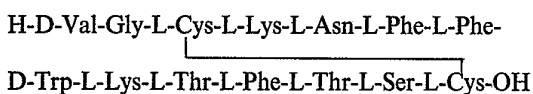
worin Y D-Val oder D-Ala bedeutet, und ihre pharmazeutisch annehmbaren Säureadditionssalze.

## 2. Als therapeutisch wirksame Verbindung nach Anspruch 1



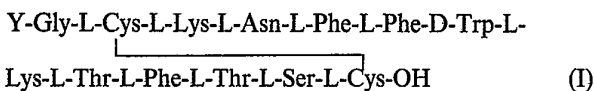
und ihre pharmazeutisch annehmbaren Säureadditionssalze.

## 3. Als therapeutisch wirksame Verbindung nach Anspruch 1

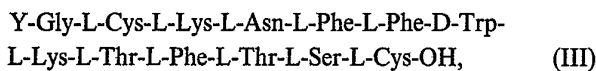


und ihre pharmazeutisch annehmbaren Säureadditionssalze.

## 4. Verfahren zur Herstellung neuer, therapeutisch wirksamer Verbindungen der Formel

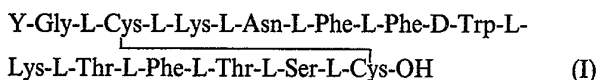


worin Y D-Val oder D-Ala bedeutet, oder von pharmazeutisch annehmbaren Säureadditionssalzen dieser Verbindungen, dadurch gekennzeichnet, dass man ein entsprechendes geradkettiges Tetradecapeptid der Formel



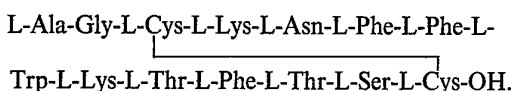
worin Y weiter oben definiert ist, mit einem Oxidationsmittel umgesetzt und erhaltene Verbindungen gegebenenfalls in die entsprechenden Salze überführt.

Die Erfindung bezieht sich auf therapeutisch wirksame Somatostatinanaloga der Formel



worin Y D-Val oder D-Ala bedeutet, und ihre pharmazeutisch annehmbaren Säureadditionssalze.

Somatostatin, das auch als die Somatotropinfreisetzung inhibierender Faktor bekannt ist, ist ein Tetradecapeptid der Formel



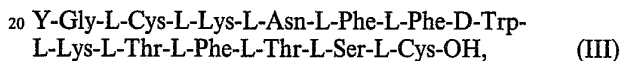
Dieses Tetradecapeptid wurde aus Schafhypothalamus-extrakten isoliert, und seine Wirkung ist die einer Inhibition der Sekretion von Wachstumshormon (GH), das

auch als Somatotropin bekannt ist, vergleiche P. Brazeau, W. Vale, R. Burgus, N. Ling, M. Butcher, J. Rivier und R. Guillemin, Science, Bd. 179, S. 77 (1973).

Ausserdem ist über die als D-Trp<sup>8</sup>-Somatostatin bezeichnete Verbindung von Brown et al., Endocrinology, Bd. 98, Nr. 2, S. 336-343 (1976) berichtet worden.

Die biologisch wirksamen Verbindungen der oben angegebenen Formel I unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Struktur von der des Somatostatins durch das Vorhandensein eines D-Tryptophanrestes in Stellung 8 anstelle eines L-Tryptophanrestes und eines D-Valin- oder D-Alaninrestes in Stellung 1 anstelle eines L-Alaninrestes. Der Einfachheit halber werden die Verbindungen der Formel I als D-Val<sup>1</sup>, D-Trp<sup>8</sup>-Somatostatin und D-Ala<sup>1</sup>, D-Trp<sup>8</sup>-Somatostatin bezeichnet.

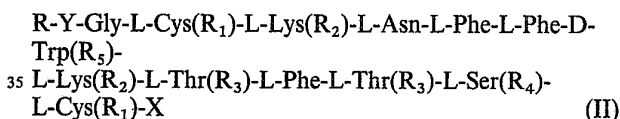
Das Verfahren zur Herstellung der neuen Verbindungen der Formel I ist dadurch gekennzeichnet, dass man ein entsprechendes geradkettiges Tetradecapeptid der Formel



worin Y weiter oben definiert ist, mit einem Oxidationsmittel umgesetzt. Erhaltene Verbindungen können in die entsprechenden Salze überführt werden.

Bei der Umsetzung werden die beiden Sulfhydrylgruppen in eine Disulfidbrücke überführt.

Die im erfindungsgemässen Verfahren eingesetzten Verbindungen der Formel III sind neu, und sie können aus den folgenden Verbindungen, die ebenfalls neu sind, erhalten werden:



In dieser Verbindung bedeuten:

Y D-Val oder D-Ala;

40 R Wasserstoff oder eine alpha-Aminoschutzgruppe,

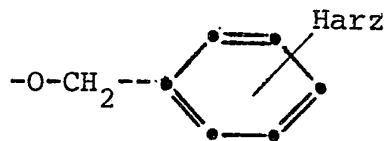
R<sub>1</sub> Wasserstoff oder eine Thioschutzgruppe,

R<sub>2</sub> Wasserstoff oder eine epsilon-Aminoschutzgruppe,

R<sub>3</sub> und R<sub>4</sub> Wasserstoff oder eine Hydroxyschutzgruppe,

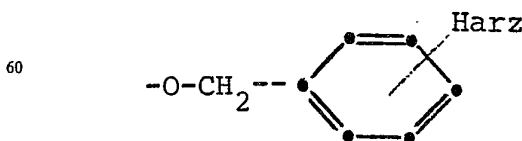
R<sub>5</sub> Wasserstoff oder eine Formylgruppe und

45 X eine Hydroxylgruppe oder die Gruppe



in der «Harz» für Polystyrol steht,

wobei die einzelnen Reste R, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> und R<sub>5</sub> Wasserstoff bedeuten, wenn X eine Hydroxylgruppe ist, und die Reste R, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> und R<sub>4</sub> eine andere der oben angegebenen Bedeutungen haben, wenn X für die Gruppe



steht.

65 Pharmazeutisch annehmbare Säureadditionssalze sind Salze mit organischen oder anorganischen Säuren, wie Salzsäure, Schwefelsäure, Sulfonsäure, Weinsäure, Fumarsäure, Bromwasserstoffsäure, Glykolsäure, Citronensäure, Malein-

säure, Phosphorsäure, Bernsteinsäure, Essigsäure, Salpetersäure, Benzoesäure, Ascorbinsäure, p-Toluolsulfonsäure, Benzolsulfonsäure, Naphthalinsulfonsäure und Propionsäure. Die bevorzugten Säureadditionssalze sind die mit Essigsäure hergestellten. Alle diese Salze können nach üblichen Methoden erhalten werden.

Beispiele für Verbindungen der Formel II sind:

R-D-Val-Gly-L-Cys(R<sub>1</sub>)-L-Lys(R<sub>2</sub>)-L-Asn-L-Phe-L-Phe-D-Trp(R<sub>5</sub>)-L-Lys(R<sub>2</sub>)-L-Thr(R<sub>3</sub>)-L-Phe-L-Thr(R<sub>3</sub>)-L-Ser(R<sub>4</sub>)-L-Cys(R<sub>1</sub>)-X

und

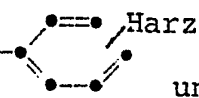
R-D-Ala-Gly-L-Cys(R<sub>1</sub>)-L-Lys(R<sub>2</sub>)-L-Asn-L-Phe-L-Phe-D-Trp(R<sub>5</sub>)-L-Lys(R<sub>2</sub>)-L-Thr(R<sub>3</sub>)-L-Phe-L-Thr(R<sub>3</sub>)-L-Ser(R<sub>4</sub>)-L-Cys(R<sub>1</sub>)-X.

Zu weiteren bevorzugten Verbindungen der Formel II gehören die folgenden:

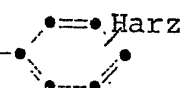
H-D-Val-Gly-L-Cys-L-Lys-L-Asn-L-Phe-L-Phe-D-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Phe-L-Thr-L-Ser-L-Cys-OH;

H-D-Ala-Gly-L-Cys-L-Lys-L-Asn-L-Phe-L-Phe-D-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Phe-L-Thr-L-Ser-L-Cys-OH;

N-(BOC)-D-Val-Gly-L-(PMB)Cys-L-(CBzOC)-Lys-L-Asn-L-Phe-L-Phe-D-Trp-L-(CBzOC)-Lys-L-(Bzl)Thr-L-Phe-L-(Bzl)Thr-L-

(Bzl)Ser-L-(PMB)Cys-O-CH<sub>2</sub>- und

N-(BOC)-D-Ala-Gly-L-(PMB)Cys-L-(CBzOC)-Lys-L-Asn-L-Phe-L-Phe-D-Trp-L-(CBzOC)Lys-L-(Bzl)Thr-L-Phe-L-(Bzl)Thr-L-(Bzl)Ser-L-

(PMB)Cys-O-CH<sub>2</sub>-

Die vorstehend zur Definition der Zwischenprodukte angegebenen Formeln umfassen Schutzgruppen für Amino-, Hydroxy- und Thio(sulphydryl)-funktionen. Die Eigenschaft einer wie hierin definierten Schutzgruppe ist eine zweifache: Einmal verhindert die Schutzgruppe, dass eine in einem bestimmten Molekül vorhandene reaktionsfähige Gruppe eine Umwandlung erfährt, wenn das Molekül Bedingungen unterworfen wird, die eine Abspaltung der sonst reaktionsfähigen Gruppe bewirken könnten. Zum anderen ist die Schutzgruppe von solcher Art, dass sie leicht unter Wiederherstellung der ursprünglichen aktiven Gruppe entfernt werden kann, und dies unter Bedingungen, die andere Teile des Moleküls nicht in Mitleidenschaft ziehen. Für diese Zwecke, d.h. zum Schutz von Amino-, Hydroxyl- und Thiogruppen, geeignete Gruppen sind allgemein bekannt, und Verfahren zu ihrer Verwendung sind in der Literatur ausführlich beschrieben. Ein Beispiel hierfür ist Protective Groups in Organic Chemistry, J.F.W. McOmie, Herausgeber, Plenum Press, New York, 1973.

In den vorstehenden Verbindungen der Formel II bedeutet R entweder ein alpha-Aminowasserstoffatom oder eine alpha-Aminoschutzgruppe. Die für R in Betracht kommenden alpha-Aminoschutzgruppen sind auf dem Peptid-

gebiet allgemein bekannt, und viele davon sind in Kapitel 2 der oben angegebenen Literaturstelle aufgeführt. Beispiele für solche Schutzgruppen sind: Benzyloxycarbonyl, p-Chlorbenzyloxycarbonyl, p-Brombenzyloxycarbonyl, o-Chlorbenzyloxycarbonyl, 2,6-Dichlorbenzyloxycarbonyl, 2,4-Dichlorbenzyloxycarbonyl, o-Brombenzyloxycarbonyl, p-Methoxybenzyloxycarbonyl, p-Nitrobenzyloxycarbonyl, t-Butyloxycarbonyl (BOC), t-Amyloxycarbonyl, 2-(p-Biphenyl)-isopropylloxycarbonyl (BpOC), Adamantylloxycarbonyl, Isopropylloxycarbonyl, Cyclopentylloxycarbonyl, Cyclohexylloxycarbonyl, Cycloheptyloxycarbonyl, Triphenylmethyl (Trityl) und p-Toluolsulfonyl. Die bevorzugte alpha-Aminoschutzgruppe ist t-Butyloxycarbonyl.

In Verbindungen der Formel II bedeutet R<sub>1</sub> entweder das Wasserstoffatom der Sulphydrylgruppe des Cysteins oder die Schutzgruppe für den Sulphydrylsubstituenten. Viele solcher Schutzgruppen sind in Kapitel 7 der oben angegebenen Literaturstelle beschrieben. Beispiele für geeignete Schutzgruppen dieser Art sind p-Methoxybenzyl, Benzyl, p-Tolyl, Benzhydryl, Acetamidomethyl, Trityl, p-Nitrobenzyl, t-Butyl, Isobutyloxymethyl und die verschiedensten Trityl-derivate. Bezüglich weiterer Gruppen wird beispielsweise auf Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie, «Synthese von Peptiden», Bd. 15/1 und 15/2 (1974), Stuttgart, verwiesen. Die bevorzugte Sulphydrylschutzgruppe ist p-Methoxybenzyl.

In den genannten Verbindungen bedeutet R<sub>2</sub> Wasserstoff an der epsilon-Aminofunktion des Lysinrestes oder eine geeignete epsilon-Aminoschutzgruppe. Beispiele für solche Schutzgruppen sind die oben in Verbindung mit der alpha-Aminoschutzgruppe aufgeführten. Typische Gruppen dieser Art sind Benzyloxycarbonyl, t-Butyloxycarbonyl, t-Amyloxycarbonyl, Cyclopentylloxycarbonyl, Adamantylloxycarbonyl, p-Methoxybenzyloxycarbonyl, p-Chlorbenzyloxycarbonyl, p-Brombenzyloxycarbonyl, o-Chlorbenzyloxycarbonyl, 2,6-Dichlorbenzyloxycarbonyl, 2,4-Dichlorbenzyloxycarbonyl, o-Brombenzyloxycarbonyl, p-Nitrobenzyloxycarbonyl, Isopropylloxycarbonyl, Cyclohexylloxycarbonyl, Cycloheptyloxycarbonyl und p-Toluolsulfonyl.

Ein bevorzugtes Verfahren zur Herstellung der im erfindungsgemässen Verfahren eingesetzten Verbindungen der Formel III wird folgendermassen durchgeführt: zuerst spaltet man die alpha-Aminoschutzgruppe der terminalen Aminosäure der Peptidkette periodisch.

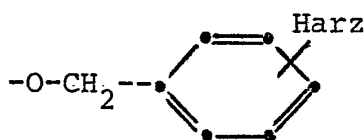
Die einzige Bedingung, die deshalb die epsilon-Aminoschutzgruppe an dem Lysinrest zu erfüllen hat, ist die, dass sie von solcher Art sein muss, dass sie unter den Bedingungen, die zur selektiven Abspaltung der alpha-Aminoschutzgruppe angewandt werden, nicht abgespalten wird. Die entsprechende Wahl der alpha-Amino- und der epsilon-Aminoschutzgruppen liegt im Rahmen des durchschnittlichen Wissens und Könnens eines Peptidchemikers und hängt von den Unterschieden im Grad der Abspaltbarkeit der einzelnen Schutzgruppen ab. So sind Gruppen wie 2-(p-Biphenyl)-isopropylloxycarbonyl (BpOC) und Trityl sehr labil und können schon in Gegenwart einer schwachen Säure abgespalten werden. Zur Abspaltung anderer Gruppen, wie t-Butyloxycarbonyl, t-Amyloxycarbonyl, Adamantylloxycarbonyl und p-Methoxybenzyloxycarbonyl, ist eine mässig starke Säure, wie Chlorwasserstoffsäure, Trifluoressigsäure oder Bortrifluorid in Essigsäure, erforderlich. Noch stärker saure Bedingungen sind nötig, um andere Schutzgruppen, wie Benzyloxycarbonyl, Halogenbenzyloxycarbonyl, p-Nitrobenzyloxycarbonyl, Cycloalkylloxycarbonyl und Isopropylloxycarbonyl, abzuspalten. Die Abspaltung der letztgenannten Gruppen erfordert drastisch saure Bedingungen, zum Beispiel die Verwendung von Bromwasserstoffsäure, Fluorwasserstoffsäure oder Bortrifluoracetat in Trifluoressigsäure.

Unter den stärker sauren Bedingungen werden selbstverständlich auch die labileren Gruppen abgespalten. Bei der Wahl der einzelnen Aminoschutzgruppen muss daher berücksichtigt werden, dass die Schutzgruppen an der alpha-Aminofunktion in Verbindung mit den Spaltungsbedingungen, die zur selektiven Entfernung allein der Schutzgruppe an der alpha-Aminofunktion angewandt werden, labiler sind als die epsilon-Aminoschutzgruppe. Deshalb ist  $R_2$  vorzugsweise eine o-Chlorbenzyloxycarbonyl- oder Cyclopentylloxycarbonylgruppe, und in Verbindung damit ist die alpha-Aminoschutzgruppe der Wahl zur Verwendung in den einzelnen Aminosäuren, die an die Peptidkette angereiht werden, vorzugsweise die t-Butyloxycarbonylgruppe.

Die Gruppen  $R_3$  und  $R_4$  bedeuten Wasserstoff oder Schutzgruppen für die alkoholische Hydroxylgruppe von Threonin und Serin. Viele solcher Schutzgruppen sind in Kapitel 3 der oben angegebenen Literaturstelle aufgeführt. Einzelne Beispiele für solche Schutzgruppen sind Alkylgruppen mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen, wie Methyl, Ethyl und t-Butyl, Benzyl- und substituierte Benzylgruppen, wie p-Methoxybenzyl, p-Nitrobenzyl, p-Chlorbenzyl und o-Chlorbenzyl, Alkanoylgruppen mit 1 bis 3 Kohlenstoffatomen, wie Formyl, Acetyl und Propionyl, und die Triphenylmethyl(Trityl)-gruppe. Wenn  $R_3$  und  $R_4$  Schutzgruppen sind, dann ist die Schutzgruppe der Wahl in beiden Fällen die Benzylgruppe.

Die Gruppe  $R_5$  bedeutet Wasserstoff oder eine Formylgruppe, die eine Schutzgruppe für die  $>NR_5$ -Gruppe des Tryptophanrestes darstellt. Die Verwendung einer solchen Schutzgruppe bleibt dem Belieben überlassen, weshalb  $R_5$  genauso gut Wasserstoff (N ungeschützt) wie die Formylgruppe (N geschützt) sein kann.

Die Gruppe X steht am Carboxylende der Tetradecapeptidkette und kann eine Hydroxylgruppe sein, so dass sich eine freie Carboxylgruppe ergibt. X kann aber auch den festen Harzträger darstellen, an den die terminale Carboxylgruppe des Peptids während seiner Synthese gebunden ist. Dieses feste Harz kann durch folgende Formel wiedergegeben werden:



In allen oben angegebenen Formeln steht  $R$ ,  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  und  $R_5$  für Wasserstoff, wenn X eine Hydroxylgruppe bedeutet. Wenn X dem festen Harzträger entspricht, dann sind die Reste  $R$ ,  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  und  $R_4$  Schutzgruppen.

Es werden folgende Abkürzungen, von denen die meisten allgemein bekannt sind und gemeinhin benutzt werden, verwendet:

Ala	- Alanin
Asn	- Asparagin
Cys	- Cystein
Gly	- Glycin
Lys	- Lysin
Phe	- Phenylalanin
Ser	- Serin
Thr	- Threonin
Trp	- Tryptophan
Val	- Valin
DCC	- N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
DMF	- N,N-Dimethylformamid
BOC	- t-Butyloxycarbonyl
PMB	- p-Methoxybenzyl
CBzOC	- o-Chlorbenzyloxycarbonyl

CPOC	- Cyclopentylloxycarbonyl
Bzl	- Benzyl
For	- Formyl
BpOC	- 2-(p-Biphenyl)-isopropylloxycarbonyl

Die Wahl der bei der Herstellung der Verbindungen der Formel III zu verwendenden Schutzgruppen gehört zwar zum Durchschnittswissen jedes synthetisch arbeitenden Peptidchemikers, doch soll noch einmal darauf hingewiesen werden, dass sich die Wahl der Schutzgruppen nach den einzelnen aufeinanderfolgenden Reaktionen, die durchgeführt werden müssen, richtet. So muss die Schutzgruppe der Wahl eine Gruppe sein, die gegenüber den bei der nachfolgenden Stufe der Reaktionsfolge angewandten Reagenzien und Bedingungen stabil ist. Beispielsweise muss, wie bereits oben bis zu einem gewissen Grad erörtert, die jeweils verwendete Schutzgruppe so beschaffen sein, dass sie unter den Bedingungen intakt bleibt, die bei der Abspaltung der alpha-Aminoschutzgruppe des terminalen Aminosäurerestes des Peptidfragments zur Vorbereitung der Anknüpfung des nächstfolgenden Aminosäurefragments an die Peptidkette angewandt werden. Bei der Auswahl der Schutzgruppe ist ferner zu berücksichtigen, dass sie während des Aufbaus der Peptidkette intakt bleiben muss und sich nach Abschluss der Synthese des gewünschten Tetradecapeptids leicht entfernen lässt. Alle diese Forderungen sind aber dem durchschnittlichen Peptidchemiker vertraut und geläufig.

Wie aus dem bereits Gesagten klargeworden sein dürfte, stellt man die Verbindungen der Formel II vorzugsweise durch Festphasensynthese her.

Diese Synthese besteht zum Beispiel aus einem stufenweisen Aufbau der Peptidkette, der am C-terminalen Ende der Peptidkette beginnt. Zunächst kann Cystein durch Umsetzung von aminogeschütztem, S-geschütztem Cystein mit einem chlormethylierten Harz oder einem Hydroxymethylharz mit seiner Carboxylfunktion mit dem Harz verknüpft werden. Die Herstellung eines Hydroxymethylharzes ist von Bodansky et al., Chem. Ind. (London), Bd. 38, S. 1597-98 (1966) beschrieben. Das chlormethylierte Harz ist im Handel erhältlich (Lab Systems, Inc., San Mateo, California, V. St. A.).

Zur Verknüpfung des C-terminalen Cysteins mit dem Harz kann das geschützte Cystein zunächst in sein Cäsiumsalz übergeführt werden. Dieses Salz wird dann gewöhnlich nach der Methode von B. F. Gisin, Helv. Chim. Acta, Bd. 56, S. 1476 (1973) umgesetzt. Das Cystein kann aber auch durch Aktivierung einer Carboxylfunktion nach bekannten Arbeitsweisen mit dem Harz verknüpft werden. Beispielsweise kann man das Cystein in Gegenwart einer die Carboxylgruppe aktivierenden Verbindungen, wie N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC), mit dem Harz umsetzen. Die weiteren Umsetzungen verlaufen bevorzugt folgendermaßen:

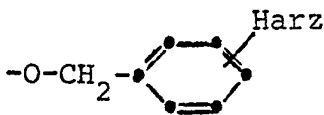
Nach Verbinden des Cysteins mit freier Carboxylgruppe mit dem Harzträger besteht der übrige Anteil des Aufbaus des Peptids in der stufenweisen Anreicherung jeder Aminosäure an den N-terminalen Teil der Peptidkette. Diese Anfügung einer Aminosäure erfordert eine Abspaltung der alpha-Aminoschutzgruppe von der Aminosäure, die den N-terminalen Teil des Peptidfragments darstellt, und danach das Anknüpfen des nächstfolgenden Aminosäurerestes an die freie und reaktionsfähige N-terminale Aminosäure. Die Abspaltung der alpha-Aminoschutzgruppe erfolgt in Gegenwart einer Säure, wie Bromwasserstoffsäure, Chlorwasserstoffsäure, Trifluoressigsäure, p-Toluolsulfonsäure, Benzolsulfonsäure, Naphthalinsulfonsäure oder Essigsäure, unter Bildung des entsprechenden Säureadditionssalzes. Bei einer anderen bekannten Methode zur Abspaltung der Aminoschutzgruppe wird Bortrifluorid verwendet. Beispielsweise wird durch Bor-

trifluorid-diethyletherat in Eisessig das aminogeschützte Peptidfragment in einen  $\text{BF}_3$ -Komplex übergeführt, der dann durch Behandlung mit einer Base, wie wässrigem Kaliumbicarbonat, in das entblockierte Peptidfragment umgewandelt werden kann. Jede dieser Methoden kann angewandt werden, solange man darauf achtet, dass so gearbeitet wird, dass die Abspaltung der N-terminalen alpha-Aminoschutzgruppe die anderen an der Peptidkette vorliegenden Schutzgruppen nicht in Mitleidenschaft zieht. Zu diesem Zweck ist es bevorzugt, die Abspaltung der N-terminalen Schutzgruppe mittels Trifluoressigsäure zu bewirken. Im allgemeinen wird die Abspaltung bei einer Temperatur von etwa  $0^\circ\text{C}$  bis Zimmertemperatur durchgeführt.

Das nach der Abspaltung am N-Ende erhaltene Produkt liegt gewöhnlich in Form eines Säureadditionssalzes mit der Säure vor, die zum Abspalten der Schutzgruppe verwendet wurde. Das Produkt kann dann durch Umsetzung mit einer schwachen Base, zum Beispiel einem tertiären Amin, wie Pyridin oder Triethylamin, in die freie terminale Amino- verbindung übergeführt werden.

Die Peptidkette ist dann in dem Zustand, in dem sie mit der nächstfolgenden Aminosäure umgesetzt werden kann. Dies kann nach jeder der verschiedenen bekannten Arbeitsweisen geschehen. Zur Anlagerung der nächstfolgenden Aminosäure an die N-terminale Peptidkette wird eine Aminosäure verwendet, die eine freie Carboxylgruppe aufweist, aber an der alpha-Aminofunktion sowie an etwa vorhandenen anderen aktiven Stellen geschützt ist. Die Aminosäure wird Bedingungen unterworfen, die die Carboxylfunktion für die Anlagerungsreaktion aktivieren. Eine solche Aktivierungsmaßnahme, die bei der Synthese angewandt werden kann, besteht in der Überführung der Aminosäure in ein gemischtes Anhydrid. Die freie Carboxylfunktion der Aminosäure wird durch Umsetzung mit einer anderen Säure, zum Beispiel einer Carbonsäure, zum Beispiel in Form ihres Säurechlorids, aktiviert. Beispiele für solche Säurechloride, die zur Ausbildung des gemischten Anhydrids verwendet werden können, sind Chlorameisensäureethylester, Chlorameisensäurephenylester, Chlorameisensäure-sec.-butylester, Chlorameisensäureisobutylester und Pivaloylchlorid.

Eine andere bevorzugte Methode der Aktivierung der Carboxylfunktion der Aminosäure für die Anlagerung ist die der Überführung der Aminosäure in ein aktiviertes Esterderivat. Beispiele für solche aktiven Ester sind ein 2,4,5-Trichlorphenylester, Pentachlorphenylester, p-Nitrophenylester und ein mit 1-Hydroxybenzotriazol oder N-Hydroxysuccinimid gebildeter Ester. Eine weitere bevorzugte Methode zur Verknüpfung der C-terminalen Aminosäure mit dem Peptidfragment besteht darin, dass die Anlagerungsreaktion in Gegenwart wenigstens einer äquimolaren Menge N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) durchgeführt wird. Die letztgenannte Methode wird für die Herstellung des Tetradecapeptids der Formel II, worin X



bedeutet, bevorzugt.

Wenn dann die gewünschte Aminosäuresequenz vorliegt, kann das Peptid von dem Harzträger entfernt werden. Hierzu wird zum Beispiel das geschützte Harzträger-Tetradecapeptid mit Fluorwasserstoff behandelt. Dadurch wird das Peptid von dem Harz abgelöst. Ausserdem können dadurch jedoch alle noch vorhandenen Schutzgruppen an den reaktionsfähigen Stellen der Peptidkette sowie die alpha-Aminoschutzgruppe an der N-terminalen Aminosäure abgespalten werden. Bei vorzugsweiser Verwendung von Fluorwasserstoff

zur Abspaltung des Peptids von dem Harz sowie zur Entfernung der Schutzgruppen ist es bevorzugt, die Reaktion in Gegenwart von Anisol durchzuführen. Es hat sich gezeigt, dass die Gegenwart von Anisol die mögliche Alkylierung bestimmter in der Peptidkette vorliegender Aminosäurereste inhibiert. Ausserdem ist es bevorzugt, die Spaltung in Gegenwart von Ethylmercaptan durchzuführen. Das Ethylmercaptan dient zum Schutz des Indolrings des Tryptophanrestes und erleichtert ausserdem die Überführung der geschützten Cysteinreste in ihre Thiolformen. Falls  $R_5$  eine Formylgruppe ist, fördert die Gegenwart von Ethylmercaptan ausserdem die Abspaltung der Formylgruppe durch Fluorwasserstoff.

Das nach der Abspaltungsreaktion erhaltene Produkt ist ein geradkettiges Peptid mit 14 Aminosäureresten. Zur Erzielung der Verbindung der Formel I muss das geradkettige Tetradecapeptid Bedingungen unterworfen werden, die zu seiner Oxidation führen, indem die beiden im Molekül vorhandenen Sulfhydrylgruppen, je eine an den Cysteinteilanteilen, in eine Disulfidbrücke überführt werden. Dies kann durch Behandlung einer verdünnten Lösung des linearen Tetradecapeptids mit einem Oxidationsmittel, zum Beispiel Jod oder Kaliumferricyanid, erreicht werden. Auch Luft kann als Oxidationsmittel verwendet werden. Dabei liegt der pH-Wert der Mischung im allgemeinen zwischen etwa 2,5 und 9,0 und vorzugsweise zwischen 6,2 und 7,2. Wenn Luft als Oxidationsmittel verwendet wird, ist die Konzentration der Peptidlösung im allgemeinen nicht höher als etwa 0,4 mg Peptid/ml Lösung und liegt vorzugsweise bei etwa 20  $\mu\text{g/ml}$ .

Die Verbindungen der Formel I können warmblütigen Säugern, einschliesslich Menschen, verabreicht werden und eignen sich besonders gut zur Entspannung der glatten Muskulatur. Insbesondere der Gastrointestinaltrakt kann durch parenterale Verabreichung kleiner Mengen dieser Verbindungen und vorzugsweise von D-Val<sup>1</sup>, D-Trp<sup>8</sup>-Somatostatinstoff entspannt werden. Diese Wirkung, die zu einer Verringerung der Darmmotilität führt, ist bei der hypotonischen Gastrointestinal-Radiographie besonders erwünscht. Ausserdem eignen sich diese Verbindungen für die Behandlung von spastischem Colon, Pylorospasmen und anderen spastischen Zuständen des Gastrointestinaltrakts sowie von Ureter- und Gallenkoliken.

Zur Erzielung einer Entspannung der glatten Muskulatur werden diese Verbindungen gewöhnlich in einer Dosis von etwa 0,1 bis 3  $\mu\text{g/kg}$  Körpergewicht und vorzugsweise von etwa 0,3 bis 1,5  $\mu\text{g/kg}$  Körpergewicht des Empfängers verabreicht. Die Verabreichung erfolgt parenteral und kann intramuskulär, subkutan oder intravenös sein. Vorzugsweise werden die Verbindungen intravenös oder intramuskulär verabreicht.

Für die parenterale Verabreichung werden im allgemeinen flüssige Dosierungseinheitsformen unter Verwendung der Verbindung mit einem pharmazeutischen Träger, wie isotonische Salzlösung, isotonisches Glycin, Lactose, Mannit, verdünnte Essigsäure, bacteriostatisches Wasser, zum Beispiel Wasser, das etwa 1% Benzylalkohol enthält, und Phosphatpufferlösungen oder mit anderen geeigneten Kombinationen von herkömmlichen Trägern hergestellt. Das Verhältnis von Träger zu Wirkstoff liegt, bezogen auf das Gewicht, im allgemeinen zwischen 25 : 1 und 1000 : 1.

Die Verbindung kann je nach Träger und Konzentration in einem geeigneten sterilen Mittel, vorzugsweise Wasser, suspendiert oder gelöst werden. Zur Herstellung von Lösungen können Verbindung und Träger in dem gewählten Mittel gelöst werden, die Lösung wird zum Beispiel filtriert und in eine Phiole oder Ampulle eingefüllt, die verschlossen wird. Es ist von Vorteil, Hilfsstoffe, zum Beispiel ein Lokalanäs-

thetikum, ein Konservierungsmittel oder ein Puffermittel, zusätzlich aufzulösen. Zur Erhöhung der Stabilität kann die Verbindung zusammen mit dem Träger in Wasser gelöst und die wässrige Lösung in einer Phiole lyophilisiert werden. Der trockene lyophilisierte Feststoff wird dann gewöhnlich in der Phiole eingeschlossen, und zur Wiederherstellung des Präparats vor seiner Verwendung wird eine Phiole mit dem Lösungsmittel mitgeliefert. Parenterale Suspensionen können praktisch auf die gleiche Weise hergestellt werden, wobei jedoch der Wirkstoff in dem Mittel suspendiert und nicht gelöst ist.

Die Verbindungen der Formel I weisen eine weitere Wirksamkeit, wenn auch nicht unbedingt in äquivalentem Masse, auf, sie inhibieren die Freisetzung von Wachstumshormon. Diese inhibitorische Wirkung ist in den Fällen von Vorteil, in denen das behandelte Lebewesen wegen einer übermässigen Sekretion von Somatotropin einer therapeutischen Behandlung bedarf; eine derartige Sekretion ist mit krankhaften Zuständen, zum Beispiel juvenilem Diabetes und Acromegalie, verbunden. Ferner zeigen diese Verbindungen andere physiologische Wirkungen, zum Beispiel eine Inhibierung der Magensäuresekretion, was sie für die Ulcerbehandlung geeignet macht, die Inhibierung von exokriner Pankreassekretion, was sie für die Behandlung von Pankreatitis geeignet macht, und die Inhibierung der Sekretion von Insulin und Glucagon. Die Verbindungen können in beliebiger Weise verabreicht werden, zum Beispiel oral, sublingual, subkutan, intramuskulär und intravenös. Für die sublinguale oder orale Verabreichung liegt die Dosis vorzugsweise zwischen etwa 1 und 100 mg/kg Körpergewicht. Die intravenösen, subkutanen oder intramuskulären Dosen liegen im allgemeinen zwischen etwa 1 µg und 1 mg/kg Körpergewicht und vorzugsweise zwischen etwa 50 und 100 µg/kg Körpergewicht. Es ist offensichtlich, dass die Dosierung innerhalb eines weiten Bereichs schwankt, weil sie sich nach dem jeweils zu behandelnden Zustand und seinem Schweregrad zu richten hat.

Die Verbindungen der Formel I können auch in Form von Tabletten oder Kapseln, die noch einen pharmazeutischen Träger enthalten, verabreicht werden. So können inerte Verdünnungsmittel oder Träger, zum Beispiel Magnesiumcarbonat oder Lactose, zusammen mit herkömmlichen Zerfallsmitteln, wie Maisstärke und Alginsäure, und Gleitmitteln, wie Magnesiumstearat, verwendet werden. Die Menge an Träger oder Verdünnungsmittel macht im allgemeinen 5 bis 95% und vorzugsweise 50 bis 85% der fertigen Zubereitung aus. Aromagebende Stoffe können gleichfalls mitverwendet werden und führen dazu, dass das fertige Präparat für die Verabreichung geschmacklich verbessert wird.

Sollen die Verbindungen der Formel I parenteral verabreicht werden, dann eignen sich als Träger unter anderen die gleichen, wie sie oben in Verbindung mit der Verwendung dieser Verbindungen zur Entspannung der glatten Muskulatur beschrieben wurden.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele weiter erläutert.

#### Präparat 1

N-t-Butyloxycarbonyl-S-p-methoxybenzyl-L-cysteinylmethyliertes Polystyrolharz

Zu 1000 ml N,N-Dimethylformamid (DMF), die das Cäsiumsalz von N-t-Butyloxycarbonyl-(S-p-methoxybenzyl)-cystein (hergestellt aus 17,5 g der freien Säure) enthalten, werden 100 g chlormethyliertes Polystyrolharz (Lab Systems, Inc., 0,75 mMol Cl/g) gegeben. Die Mischung wird 5 Tage bei Zimmertemperatur gerührt. Dann wird das Harz abfiltriert und dreimal abwechselnd mit einer Mischung aus

85% DMF und 15% Wasser und mit DMF und anschliessend zweimal mit DMF gewaschen. Eine Suspension des Harzes in 1000 ml DMF wird mit einer Lösung von 16 g (83,4 mMol) Cäsiumacetat versetzt. Die Mischung wird 9 Tage bei Zimmertemperatur gerührt. Danach wird das Harz abfiltriert und abwechselnd jeweils dreimal mit einer Mischung aus 85% DMF und 15% Wasser und mit DMF gewaschen. Das Harz wird mit  $\text{CHCl}_3$  gewaschen und dann viermal in einem Scheidetrichter in  $\text{CHCl}_3$  suspendiert, wobei die Flüssigkeit zur Entfernung von Feinteilen jedesmal abgezogen wird. Das Harz wird abfiltriert, mit 95%igem Ethanol und dann abwechselnd jeweils dreimal mit Benzol und 95%igem Ethanol gewaschen. Durch Trocknen des Harzes im Vakuum bei 30 °C werden 115,3 g des in der Überschrift genannten Produkts erhalten. Die Aminosäureanalyse ergibt 0,254 mMol Cys/g Harz. Das Cystein wird als Cysteinsäure nach einer Säurehydrolyse bestimmt, die unter Verwendung einer 1 : 1-Mischung aus Dioxan und konzentrierter Salzsäure, wozu eine kleine Menge Dimethylsulfoxid gegeben worden ist, durchgeführt wird.

#### Präparat 2

N-t-Butyloxycarbonyl-D-valyl-glycyl-L-(S-p-methoxybenzyl)-cysteinyl-L-(N<sup>ε</sup>-o-chlorbenzyloxycarbonyl)-lysyl-L-asparaginyll-L-phenylalanyl-L-phenylalanyl-D-tryptophyl-L-(N<sup>ε</sup>-o-chlorbenzyloxycarbonyl)-lysyl-L-(O-benzyl)-threonyl-L-phenylalanyl-L-(O-benzyl)-treonyl-L-(O-benzyl)-seryl-L-(S-p-methoxybenzyl)-cysteinylmethyliertes Polystyrolharz

5,0 g des nach Präparat 1 erhaltenen Produkts werden in das Reaktionsgefäss eines automatischen Peptid-synthesegeräts, Beckman 990, gegeben und zwölf der übrigen dreizehn Aminosäuren werden unter Verwendung des automatischen Synthesegeräts angefügt. Das gebildete geschützte Tridecapeptidharz wird in zwei gleiche Anteile aufgeteilt, und in einen dieser Anteile wird der abschliessende Rest eingeführt. Die verwendeten Aminosäuren sowie die Reihenfolge ihrer Verwendung sind wie folgt: (1) N-t-Butyloxycarbonyl-(O-benzyl)-L-serin; (2) N-t-Butyloxycarbonyl-(O-benzyl)-L-threonin; (3) N-t-Butyloxycarbonyl-L-phenylalanin; (4) N-t-Butyloxycarbonyl-(O-benzyl)-L-threonin; (5) N<sup>α</sup>-t-Butyloxycarbonyl-N<sup>ε</sup>-o-chlorbenzyloxycarbonyl-L-lysin; (6) N<sup>α</sup>-t-Butyloxycarbonyl-D-tryptophan; (7) N-t-Butyloxycarbonyl-L-phenylalanin; (8) N-t-Butyloxycarbonyl-L-phenylalanin; (9) N-t-Butyloxycarbonyl-L-asparaginp-nitrophenylester; (10) N<sup>α</sup>-t-Butyloxycarbonyl-N<sup>ε</sup>-o-chlorbenzyloxycarbonyl-L-lysin; (11) N-t-Butyloxycarbonyl-(S-p-methoxybenzyl)-L-cystein; (12) N-t-Butyloxycarbonyl-glycin und (13) N-t-Butyloxycarbonyl-D-valin. Die Reihenfolge von Schutzgruppenentfernung, Neutralisation, Anknüpfung und erneute Anknüpfung für die Einführung jeder einzelnen Aminosäure in das Peptid ist wie folgt: (1) Drei Wäschen von jeweils 3 Minuten mit Chloroform (10 ml/g Harz); (2) Entfernung der BOC-Gruppe durch zwei Behandlungen von jeweils 20 Minuten mit jeweils 10 ml/g Harz einer Mischung aus 29% Trifluoressigsäure, 48% Chloroform, 6% Triethylsilan und 17% Methylenchlorid; (3) zwei Wäschen von jeweils 3 Minuten mit Chloroform (10 ml/g Harz); (4) eine Wäsche von 3 Minuten mit Methylenchlorid (10 ml/g Harz); (5) drei Wäschen von jeweils 3 Minuten mit einer Mischung aus 90% t-Butylalkohol und 10% t-Amylalkohol (10 ml/g Harz); (6) drei Wäschen von je 3 Minuten mit Methylenchlorid (10 ml/g Harz); (7) Neutralisation durch drei Behandlungen von je 3 Minuten mit 3% Triethylamin in Methylenchlorid (10 ml/g Harz); (8) drei Wäschen von jeweils 3 Minuten mit Methylenchlorid (10 ml/g Harz); (9) drei Wäschen von jeweils 3 Minuten mit einer Mischung aus 90% t-Butylalkohol und 10% t-Amylalkohol (10 ml/g

Harz); (10) drei Wäschen von jeweils 3 Minuten mit Methylenchlorid (10 ml/g Harz); (11) Zugabe von 1,0 mMol/g Harz der geschützten Aminosäure und 1,0 mMol/g Harz N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) in 10 ml/g Harz Methylenchlorid mit anschliessendem Vermischen während 120 Minuten; (12) drei Wäschen von jeweils 3 Minuten mit Methylenchlorid (10 ml/g Harz); (13) drei Wäschen von je 3 Minuten mit einer Mischung aus 90% t-Butylalkohol und 10% t-Amylalkohol (10 ml/g Harz); (14) drei Wäschen von jeweils 3 Minuten mit Methylenchlorid (10 ml/g Harz); (15) Neutralisation durch drei Behandlungen von je 3 Minuten mit 3% Triethylamin in Methylenchlorid (10 ml/g Harz); (16) drei Wäschen von je 3 Minuten mit Methylenchlorid (10 ml/g Harz); (17) drei Wäschen von je 3 Minuten mit einer Mischung aus 90% t-Butylalkohol und 10% t-Amylalkohol (10 ml/g Harz); (18) drei Wäschen von je 3 Minuten mit Methylenchlorid (10 ml/g Harz); (19) drei Wäschen von je 3 Minuten mit DMF (10 ml/g Harz); (20) Zugabe von 1,0 mMol/g Harz der geschützten Aminosäure und 1,0 mMol/g Harz N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) in 10 ml/g Harz einer 1 : 1-Mischung aus DMF und Methylenchlorid mit anschliessendem Vermischen während 120 Minuten; (21) drei Wäschen von je 3 Minuten mit DMF (10 ml/g Harz); (22) drei Wäschen von je 3 Minuten mit Methylenchlorid (10 ml/g Harz); (23) drei Wäschen von je 3 Minuten mit einer Mischung aus 90% t-Butylalkohol und 10% t-Amylalkohol (10 ml/g Harz); (24) drei Wäschen von je 3 Minuten mit Methylenchlorid (10 ml/g Harz); (25) Neutralisation durch drei Behandlungen von je 3 Minuten mit 3% Triethylamin in Methylenchlorid (10 ml/g Harz); (26) drei Wäschen von je 3 Minuten mit Methylenchlorid (10 ml/g Harz); (27) drei Wäschen von je 3 Minuten mit einer Mischung aus 90% t-Butylalkohol und 10% t-Amylalkohol (10 ml/g Harz); und (28) drei Wäschen von je 3 Minuten mit Methylenchlorid (10 ml/g Harz).

Die obige Behandlungsfolge wird zur Anreicherung jeder einzelnen Aminosäure mit Ausnahme der Glycin- und Asparaginreste angewandt. Die Anreicherung des Glycins erfolgt unter Anwendung nur der Stufen 1 bis 18. Der Asparaginrest wird über seinen aktiven p-Nitrophenylester eingeführt. Hierzu wird die obige Stufe (11) zu der folgenden dreistufigen Reihenfolge abgewandelt: (a) drei Wäschen von je 3 Minuten mit DMF (10 ml/g Harz); (b) Zugabe von 1,0 mMol/g Harz des p-Nitrophenylesters von N-t-Butyloxycarbonyl-L-asparagin in 10 ml/g Harz einer 1 : 3-Mischung aus DMF und Methylenchlorid mit anschliessendem Vermischen während 720 Minuten; und (c) drei Wäschen von je 3 Minuten mit DMF (10 ml/g Harz). Auch die obige Stufe (20) wird durch die Verwendung des p-Nitrophenylesters von N-t-Butyloxycarbonyl-L-asparagin in einer 3 : 1-Mischung aus DMF und Methylenchlorid mit anschliessendem Vermischen während 720 Minuten abgewandelt.

Das fertige Peptidharz wird im Vakuum getrocknet. Das Produkt wird durch 72stündiges Sieden unter Rückfluss in einer 1 : 1-Mischung aus konzentrierter Salzsäure und Dioxan hydrolysiert. Die Aminosäureanalyse des erhaltenen Produkts ergibt unter Verwendung von Lysin als Standard folgende Werte: Asn, 1,00; 2Thr, 2,18; Ser, 0,95; Gly, 1,00; Val, 0,99; 3Phe, 3,45; 2Lys, 2,00.

### Präparat 3

D-Valyl-glycyl-L-cysteinyl-L-lysyl-L-asparaginyll-phenylalanyl-L-phenylalanyl-D-tryptophyl-L-lysyl-L-threonyl-

L-phenylalanyl-L-threonyl-L-seryl-L-cystein  
Zu einer Mischung aus 7,2 ml Anisol und 7,2 ml Ethylmercaptan werden 3,914 g (bei einem Substitutionswert von 0,155 mMol/g) des geschützten Tetradecapeptidharzes von

Präparat 2 gegeben. Die Mischung wird in flüssigem Stickstoff gekühlt und durch Destillation mit 80 ml flüssigem Fluorwasserstoff versetzt. Die erhaltene Mischung wird sich auf 0 °C erwärmen gelassen und 2 Stunden gerührt. Der Fluorwasserstoff wird durch Destillation entfernt. Die zurückbleibende Mischung wird mit Ether versetzt und auf 0 °C abgekühlt. Der gebildete Feststoff wird abfiltriert und mit Ether gewaschen. Das Produkt wird getrocknet, und das von Schutzgruppen befreite Tetradecapeptid wird unter Verwendung von 1m Essigsäure und 50%iger Essigsäure aus der Harzmischung extrahiert. Die Essigsäurelösung wird sofort im Dunkeln gefriergetrocknet. Der so erhaltene schwachgelbliche Feststoff wird in einer Mischung aus 10 ml entgaster 0,2m Essigsäure und 4 ml Eisessig suspendiert. Die Suspension wird mit 6 ml 50%iger Essigsäure gelinde erwärmt, bis eine klare gelbe Lösung gebildet ist, die auf eine Säule aus Sephadex G-25 F aufgebracht wird. Die Einzelheiten der Chromatographie sind wie folgt: Lösungsmittel, entgaste 0,2m Essigsäure; Säulengrösse 7,5 × 150 cm; Temperatur 26 °C; Strömungsgeschwindigkeit 1670 ml/Stunde; Fraktionsvolumen 25,05 ml.

Die Absorption jeder Fraktion bei 280 m $\mu$  wird gegen die Fraktionsnummer aufgetragen, und es ergibt sich ein grosser breiter Höchstwertbereich mit einer anschliessenden Schulter. Der grösste Teil des Höchstwertbereichs entspricht aufgrund der UV-Spektroskopie dem Produkt. Diejenigen Fraktionen, die vereinigt werden, und ihre Austrittsvolumina sind wie folgt:

Fraktionen 207 bis 233 (5160 bis 5837 ml, Spitze = 5515 ml).

Diese Fraktionenvereinigung umfasst nicht die Schulter an der Rückseite. Die UV-Spektroskopie zeigt das Vorhandensein von 470 mg Produkt. (Ausbeute = 46,4%). Eine Ellman-Titration einer Probe zeigt einen Gehalt an freiem Sulfhydryl von 95% der Theorie.

### Beispiel 1

Oxidation zu D-Val<sup>1</sup>, D-Trp<sup>8</sup>-Somatostatin

677 ml der nach Präparat 3 erhaltenen Lösung des reduzierten D-Val<sup>1</sup>, D-Trp<sup>8</sup>-Somatostatins werden mit destilliertem Wasser auf eine Konzentration von 50  $\mu$ g/ml verdünnt. Der pH-Wert der Mischung wird mit konzentriertem Ammoniumhydroxid auf 6,7 eingestellt. Die Lösung wird 64 Stunden im Dunkeln bei 4 °C gerührt, wonach eine Ellman-Titration anzeigt, dass die Oxidation beendet ist.

Die Mischung wird im Vakuum auf ein Volumen von 45 ml eingeengt und mit 45 ml Eisessig versetzt. Danach wird die Mischung an einer Säule aus Sephadex G-25 F entsalzt. Die Einzelheiten der Chromatographie sind folgende: Lösungsmittel, entgaste 50%ige Essigsäure, Säulengrösse 5,0 × 215 cm, Temperatur 26 °C, Strömungsgeschwindigkeit 148 ml/Stunde, Fraktionsvolumen 17,3 ml.

Die Absorption jeder Fraktion bei 280 m $\mu$  wird gegen die Fraktionsnummer aufgetragen, wodurch zwei grosse Spitzen erhalten werden. Die erste Spitze entspricht den aggregierten Formen des Produkts, und die zweite Spitze entspricht monomerem Produkt. Das der zweiten Spitze entsprechende Material wird vereinigt (Fraktionen 116 bis 155, 2000 bis 2685 ml). Die UV-Spektroskopie zeigt an, dass in der Probe 279 mg Produkt enthalten sind (Ausbeute = 59,4%). Die Lösung wird im Dunklen gefriergetrocknet.

Der so erhaltene weisse Feststoff wird in zwei ungefähr gleichen Teilen erneut chromatographiert. Der erste Teil wird in 25 ml entgaster 50%iger Essigsäure gelöst und an einer Säule aus Sephadex G-25 F adsorbiert. Einzelheiten der Chromatographie: Lösungsmittel, entgaste 50%ige Essigsäure; Säulengrösse 5,0 × 215 cm; Temperatur 26 °C; Strö-

mungsgeschwindigkeit 148 ml/Stunde; Fraktionsvolumen 17,3 ml.

Das Auftragen der Absorption jeder Fraktion bei 280 m $\mu$  gegen die Fraktionsnummer ergibt zwei grosse Spitzen. Es wird ein üblicher Schnitt der zweiten Spitze vorgenommen. Die Fraktionen 119 bis 125 (Austrittsvolumina 2128 bis 2256 ml) werden vereinigt. Die UV-Spektroskopie zeigt die Gegenwart von 65,3 mg Produkt in dieser Probe. Das gewünschte Produkt wird durch Gefriertrocknung der Lösung im Dunkeln erreicht.

Der zweite Teil wird genauso wie der erste erneut chromatographiert, wobei vergleichbare Ergebnisse erhalten werden. Die beiden guten Produkte werden vereinigt und ergeben zusammen nach der UV-Spektroskopie 126 mg (45,2% gereinigtes Produkt). Das vereinigte Produkt wird in 15 ml entgaster 0,2m Essigsäure gelöst und auf eine Säule aus Sephadex G-25 F aufgegeben. Einzelheiten der Chromatographie: Lösungsmittel entgaste 0,2m Essigsäure; Säulengrösse 5,0  $\times$  150 cm; Temperatur 26 °C; Strömungsgeschwindigkeit 466 ml/Stunde; Fraktionsvolumen 16,3 ml.

Durch Auftragen der Absorption jeder Fraktion bei 280 m $\mu$  gegen die Fraktionsnummer wird ein grosser Höchstwertbereich erhalten. Die UV-Spektroskopie ergibt, dass der grösste Teil des Höchstwertbereichs aus ausgezeichnetem Produkt besteht. Die Fraktionen 160 bis 180 (2592 bis 2934 ml, Spitze = 2685 ml) werden vereinigt und im Dunkeln gefriergetrocknet. Die UV-Spektroskopie ergibt die Gegenwart von 90,4 mg Produkt (Ausbeute 71,7%).

Optische Drehung  $[\alpha]_D^{26} = -56,1^\circ$  (1% Essigsäure).

Aminosäureanalyse: Val, 1,0; Gly, 0,97; 2Cys, 1,62; 2Lys, 2,00; Asn, 1,01; 3Phe, 2,87; Trp, 1,02; 2Thr, 1,83; Ser, 0,81.

Die obigen Ergebnisse sind als Verhältnisse von Lys/2 = 1,0 ausgedrückt. Alle Werte sind Mittelwerte von zwei 21stündigen Hydrolysen ohne Spüler. Tryptophan wird UV-spektroskopisch (als Verhältnis zu Lys/2) bestimmt. Serin wird nicht unter Berücksichtigung der Verluste während der Hydrolyse korrigiert.

Das obige Produkt enthält geringe Mengen an Verunreinigungen. Falls erwünscht, kann das Produkt durch präparative Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) weiter gereinigt werden.

Ein anderes mögliches Verfahren zur Oxidation des reduzierten D-Val<sup>1</sup>, D-Trp<sup>8</sup>-Somatostatins zu D-Val<sup>1</sup>, D-Trp<sup>8</sup>-Somatostatin besteht in der Behandlung mit Kaliumferricyanid. Die Oxidation wird in einer wässrigen Lösung, die wie oben beschrieben auf pH 6,7 eingestellt ist, durchgeführt. Zu der Mischung wird eine wässrige Lösung von Kaliumferricyanid bis zu einer Endkonzentration gegeben, die etwa dem 3,3fachen der des reduzierten D-Val<sup>1</sup>, D-Trp<sup>8</sup>-Somatostatins entspricht. Die Lösung wird etwa 2 Stunden im Dunkeln bei Zimmertemperatur gerührt. Die Vollständigkeit der Oxidation wird durch eine Ellman-Titration ermittelt.

#### Präparat 4

N-t-Butyloxycarbonyl-D-alanyl-glycyl-L-(S-p-methoxybenzyl)-cysteinyl-L-(N<sup>ε</sup>-o-chlorbenzyloxycarbonyl)lysyl-L-asparaginyll-phenylalanyl-L-phenylalanyl-D-tryptophyl-L-(N<sup>ε</sup>-o-chlorbenzyloxycarbonyl)-lysyl-L-(O-benzyl)threonyll-phenylalanyl-L-(O-benzyl)-threonyll-L-(O-benzyl)-seryl-L-(S-p-methoxybenzyl)-cysteinyl-methyliertes Polystyrolharz

Diese Verbindung wird unter Verwendung des zweiten Teils des nach Präparat 2 hergestellten Tridecapeptids und Anreihung von N-t-Butyloxycarbonyl-D-alanin anstelle von N-t-Butyloxycarbonyl-D-valin hergestellt.

Die Aminosäureanalyse des nach 21stündiger Hydrolyse in einer 1 : 1-Mischung aus konzentrierter Salzsäure und Dioxan beim Sieden unter Rückfluss erhaltenen Produkts ergibt die folgenden Werte, wobei Lysin als Standard verwendet wird: Asn, 1,16; 2Thr, 2,14; Ser, 1,04; Gly, 1,09; Ala, 1,17; 3Phe, 2,88; 2Lys, 2,00.

#### Präparat 5

D-Alanyl-glycyl-L-cysteinyl-L-lysyl-L-asparaginyll-phenylalanyl-L-phenylalanyl-D-tryptophyl-L-lysyl-L-threonyll-phenylalanyl-L-threonyll-seryl-L-cystein

Die in der Überschrift genannte Verbindung wird nach der in Präparat 3 beschriebenen Arbeitsweise unter Verwendung von 3,772 g (bei einem Substitutionswert von 0,156 mMol/g) des nach Beispiel 5 erhaltenen Produkts hergestellt. Die Reinigung des Produkts erfolgt durch Chromatographie an einer Säule aus Sephadex G-25 F. Bedingungen der Chromatographie: Lösungsmittel entgaste 0,2m Essigsäure; Säulengrösse 7,5  $\times$  150 cm; Temperatur 26 °C; Strömungsgeschwindigkeit 1658 ml/Stunde; Fraktionsvolumen 24,87 ml.

Durch Auftragen der Absorption jeder Fraktion bei 280 m $\mu$  gegen die Fraktionsnummer wird ein grosser breiter Höchstwertbereich mit einer anschliessenden Schulter erhalten. Aufgrund der UV-Spektroskopie entspricht der Hauptteil des Höchstwertbereichs dem Produkt.

Die Fraktionen, die vereinigt werden, und ihre Austrittsvolumina sind folgende:

Fraktionen 206 bis 230 (5098 bis 5720 ml).

Diese Fraktionsvereinigung umfasst nicht die anschliessende Schulter. Die UV-Spektroskopie ergibt, dass in der Probe 403,9 mg Produkt (Ausbeute = 41,9%) enthalten sind. Eine Ellman-Titration einer Probe ergibt einen Gehalt an freiem Sulfhydryl von 93% der Theorie.

#### Beispiel 2

Oxidation zu D-Ala<sup>1</sup>, D-Trp<sup>8</sup>-Somatostatin

Das nach Präparat 5 erhaltene reduzierte D-Ala<sup>1</sup>, D-Trp<sup>8</sup>-Somatostatin wird wie in Beispiel 1 beschrieben behandelt. 622 ml der Lösung (Theorie 403,9 mg) werden mit destilliertem Wasser bis zu einer Konzentration von 50  $\mu$ g/ml verdünnt und dann mit konzentriertem Ammoniumhydroxid auf einen pH-Wert von 6,7 eingestellt. Die Mischung wird 41 Stunden bei Zimmertemperatur im Dunkeln gerührt. Die Mischung wird im Vakuum auf etwa 40 ml eingeeengt und dann mit 40 ml Eisessig verdünnt. Die Mischung wird dann an einer Säule aus Sephadex G-25 F adsorbiert. Bedingungen der Chromatographie: Lösungsmittel entgaste 50%ige Essigsäure; Säulengrösse 5,0  $\times$  215 cm; Temperatur 26 °C; Strömungsgeschwindigkeit 151 ml/Stunde; Fraktionsvolumen 17,61 ml.

Durch Auftragen der Absorption dieser Fraktion bei 280 m $\mu$  gegen die Fraktionsnummer werden zwei grosse breite Höchstwertbereiche erhalten. Der erste Höchstwertbereich entspricht aggregierten Formen des Produkts und der zweite Bereich entspricht gutem monomerem Produkt. Das durch den zweiten Höchstwertbereich wiedergegebene Produkt (Fraktionen 113 bis 155, 1971 bis 2728 ml) wird vereinigt und im Dunkeln gefriergetrocknet. Der so erhaltene Feststoff wird in etwa zwei gleichen Anteilen erneut chromatographiert. Der erste Anteil wird in 22 ml entgaster 50%iger Essigsäure gelöst, und die Lösung wird auf eine Säule aus Sephadex G-25 F aufgegeben. Bedingungen der Chromatographie: Lösungsmittel entgaste 50%ige Essigsäure; Säulengrösse 5,0  $\times$  215 cm; Temperatur 26 °C; Strömungsgeschwindigkeit 153 ml/Stunde; Fraktionsvolumen 17,85 ml.

Durch Auftragen der Absorption jeder Fraktion bei 280 m $\mu$  gegen die Fraktionsnummer werden zwei grosse Höchstwertbereiche erhalten. Ein üblicher Schnitt des zweiten Höchstwertbereichs wird durch Vereinigung der Fraktionen 121 bis 127 (Austrittsvolumina von 2142 bis 2267 ml) vorgenommen. Die UV-Spektroskopie zeigt die Gegenwart von 56,7 mg Produkt in dieser Probe an. Das gewünschte Produkt wird durch Gefriertrocknung und Lösung im Dunkeln erhalten.

Der zweite Anteil wird in der gleichen Weise wie der erste erneut chromatographiert. Die Produkte werden vereint (126,3 mg durch UV-Spektroskopie – 31,3% Ausbeute aus der reduzierten Form). Das Produkt wird in 21 ml entgaster 0,2m Essigsäure gelöst und auf eine Säule aus Sephadex G-25 F aufgebracht. Bedingungen der Chromatographie: Lösungsmittel entgaste 0,2m Essigsäure; Säulengrösse 5,0  $\times$  150 cm; Temperatur 26 °C; Strömungsgeschwindigkeit 449 ml/Stunde; Fraktionsvolumen 15,71 ml.

Durch Auftragen der Absorption jeder Fraktion bei 280 m $\mu$  gegen die Fraktionsnummern wird ein grosser Höchstwertbereich erhalten. Die UV-Spektroskopie zeigt, dass der grösste Teil dieses Bereichs dem Produkt entspricht. Die Fraktionen 169 bis 188 (2640 bis 2953 ml, Spitze = 2705 ml) werden vereint und im Dunkeln gefriertrocknet. Die UV-Spektroskopie ergibt die Gegenwart von 85,2 mg Produkt (67,5%).

Optische Drehung  $[\alpha]_D^{26} = -54,9^\circ$  (1% Essigsäure).

Aminosäureanalyse: Ala, 1,05; Gly, 1,0; 2Cys, 1,58; 2Lys, 2,0; Asn, 1,10; 3Phe, 2,92; Trp, 1,02; 2Thr, 1,98; Ser, 0,88.

Die obigen Ergebnisse sind als Verhältnisse zu Lys/2 = 1,0 ausgedrückt. Alle Werte sind Mittelwerte von zwei 21stündigen Hydrolysen ohne Spüler. Tryptophan wird UV-spektroskopisch (als Verhältnis zu Lys/2) bestimmt. Serin wird nicht unter Berücksichtigung der Verluste während der Hydrolyse korrigiert.

D-Val<sup>1</sup>, D-Trp<sup>8</sup>-Somatostatin wird an Hunden auf seine Inhibition der Magensäuresekretion in vivo geprüft. Bei 6 Hunden mit chronischer Fistel und Heidenhain-Sack wird die HCl-Sekretion im Magen durch Infusion des C-terminalen Tetrapeptids von Gastrin in einer Geschwindigkeit von 0,5  $\mu$ g/kg und Stunde induziert. Jeder Hund dient als seine eigene Blindprobe. Nach 1 Stunde konstanter Sekretion von HCl wird D-Val<sup>1</sup>, D-Trp<sup>8</sup>-Somatostatin 1 Stunde lang mit einer Geschwindigkeit von 0,15  $\mu$ g/kg und Stunde infusiert. Das Auffangen von Magensäureproben wird mit Zwischenräumen von 15 Minuten weitere 1,5 Stunden fortgesetzt. Die Proben werden mit Hilfe eines automatischen Titrationsgeräts auf pH 7 titriert. Die maximale inhibitorische Wirkung des D-Val<sup>1</sup>, D-Trp<sup>8</sup>-Somatostatins wird gegen die Dosis-Wirkungs-Kurve von Somatostatin extrapoliert und die relative Wirkungsstärke des Analogon zu der von Somatostatin wird als prozentuale Aktivität ausgedrückt. D-Val<sup>1</sup>, D-Trp<sup>8</sup>-Somatostatin inhibiert die durch das C-terminale Tetrapeptid von Gastrin induzierte konstante Säuresekretion um 48,22  $\pm$  6,45% (mittlere Fehlergrenze). Diese Wirkung ist der von 0,175  $\mu$ g/kg und Stunde Somatostatin äquivalent. Die Aktivität im Verhältnis zu der von Somatostatin liegt somit bei 116%. Eine noch höher gereinigte Probe von D-Val<sup>1</sup>, D-Trp<sup>8</sup>-Somatostatin, die in Dosen von 0,200, 0,166 und 0,138  $\mu$ g/kg und Stunde verabreicht wird, inhibiert die durch das C-terminale Tetrapeptid von Gastrin induzierte konstante Säuresekretion um 77,63, 71,57 bzw. 67,8%. Im Verhältnis zu der Aktivität von Somatostatin beträgt diese Aktivität 302 bis 325%.

Bei 0,20  $\mu$ g/kg und Stunde unter den gleichen Bedingungen geprüftes D-Ala<sup>1</sup>, D-Trp<sup>8</sup>-Somatostatin inhibiert die durch das C-terminale Tetrapeptid von Gastrin induzierte

konstante Säuresekretion um 73,61  $\pm$  3,66% (mittlere Fehlergrenze). Diese Wirkung ist der von 0,550  $\mu$ g/kg und Stunde Somatostatin äquivalent. Im Verhältnis zu der Aktivität von Somatostatin beträgt die Aktivität somit 275%.

D-Val<sup>1</sup>, D-Trp<sup>8</sup>-Somatostatin und D-Ala<sup>1</sup>, D-Trp<sup>8</sup>-Somatostatin wurden ausserdem auf ihre Wirkung auf die Darmmotilität von bei Bewusstsein befindlichen Hunden geprüft. Es werden 3 Hunde mit Intraluminalkatheter im Antrum, Duodeum und Pylorus verwendet. Druckänderungen in der Darmröhre werden auf einem Visicorder unter Verwendung von Belastungsmessgeräten und Miniatur-Lichtstrahlgalvanometern aufgezeichnet. Nach Einstellung eines konstanten Kontrollwerts wird die zu prüfende Verbindung während 10 Minuten intravenös infusiert. Die zu prüfende Verbindung erhöht zunächst den intralumenalen Druck im Pylorus und senkt ihn dann, wohingegen der Druck im Duodenum und Antrum während des ganzen Versuchs erniedrigt bleibt. Das Minimum der wirksamen Dosis, die zur Erhöhung des Pylorusdrucks und zur Erniedrigung des Duodenum- und Antrumdrucks erforderlich ist, beträgt etwa 0,05  $\mu$ g/kg und 10 Minuten für D-Val<sup>1</sup>, D-Trp<sup>8</sup>-Somatostatin und etwa 0,1  $\mu$ g/kg und 10 Minuten für D-Ala<sup>1</sup>, D-Trp<sup>8</sup>-Somatostatin. Diese Werte stehen einem Wert für Somatostatin selbst von 0,125 bis 0,25  $\mu$ g/kg und 10 Minuten gegenüber.

D-Val<sup>1</sup>, D-Trp<sup>8</sup>-Somatostatin und D-Ala<sup>1</sup>, D-Trp<sup>8</sup>-Somatostatin wurden ausserdem auf ihre Wirkung hinsichtlich der Freisetzung von Wachstumshormon geprüft. Bei der angewandten Arbeitsweise werden normale männliche Sprague-Dawley-Ratten mit einem Gewicht von 100 bis 120 g (Laboratory Supply Company, Indianapolis, Indiana) verwendet. Die Prüfung ist eine Abwandlung der Methode von P. Brazeau, W. Vale und R. Guillemin, *Endocrinology*, Bd. 94, S. 184 (1974). Bei dieser Prüfung werden insgesamt fünf Gruppen von jeweils 8 Ratten für das Testen jeder Verbindung verwendet. Allen Ratten wird Natriumpentobarbital intraperitoneal verabreicht, um die Wachstumshormonsekretion zu stimulieren. Eine Gruppe dient als Kontrolle und erhält nur Salzlösung. Zwei Gruppen erhalten Somatostatin, eine in einer Menge von 2  $\mu$ g/Ratte subkutan und die andere in einer Menge von 50  $\mu$ g/Ratte subkutan. Die beiden anderen Gruppen erhalten die zu prüfende Verbindung, eine in einer Menge von 10  $\mu$ g/Ratte subkutan und die andere in einer Menge von 0,4  $\mu$ g/Ratte subkutan. Die Serumkonzentration an Wachstumshormon wird 20 Minuten nach der gleichzeitigen Verabreichung von Natriumpentobarbital und Testverbindung bestimmt. Dann wird das Mass der Inhibition der Serumwachstumshormonkonzentration bei der Kontrollgruppe bestimmt, und die relativen Aktivitäten von Testverbindung und Somatostatin selbst werden verglichen.

In einer Dosierung von 0,4  $\mu$ g/Ratte bzw. von 10  $\mu$ g/Ratte inhibiert D-Val<sup>1</sup>, D-Trp<sup>8</sup>-Somatostatin die Steigerung der Wachstumshormonsekretion um 14 bzw. 42% gegenüber der Kontrolle. In einer Dosis von 2  $\mu$ g/Ratte hat Somatostatin keine Wirkung auf die Erhöhung der Wachstumshormonsekretion, wohingegen es bei 50  $\mu$ g/Ratte die Steigerung der Wachstumshormonsekretion um 56% gegenüber der Kontrolle inhibiert.

In einer Dosis von 0,4  $\mu$ g/Ratte bzw. von 10  $\mu$ g/Ratte inhibiert D-Ala<sup>1</sup>, D-Trp<sup>8</sup>-Somatostatin die Steigerung der Wachstumshormonsekretion um 54 bzw. um 91% gegenüber der Kontrolle. Somatostatin in einer Dosis von 2  $\mu$ g/Ratte bzw. von 50  $\mu$ g/Ratte inhibiert die Steigerung der Wachstumshormonsekretion um 40 bzw. um 87% gegenüber der Kontrolle.

D-Val<sup>1</sup>, D-Trp<sup>8</sup>-Somatostatin und D-Ala<sup>1</sup>, D-Trp<sup>8</sup>-Somatostatin wurden in vivo auf ihre Wirksamkeit der In-

hibierung der Glucagon- und Insulinsekretion nach Stimulierung mit L-Alanin geprüft. Normale mischrassige Hunde beiderlei Geschlechts werden über Nacht ohne Futter belassen. Zur Kontrolle werden Blutproben entnommen und danach wird mit der intravenösen Infusion von Salzlösung, Somatostatin bzw. Testverbindung begonnen. 30 Minuten später wird L-Alanin zusätzlich intravenös während 15 Minuten verabreicht. Die Infusion von Salzlösung, Somatostatin bzw. Testverbindung wird nach Beendigung der L-Alanininfusion noch 15 Minuten fortgesetzt. Die Infusion von L-Alanin verursacht eine abrupte Steigerung der Serum-

konzentration an Glucagon und Insulin, die nach Beendigung der L-Alanininfusion auf die Kontrollkonzentration zurückgeht. Bei dem obigen Versuch ergibt sich, dass die Mindestdosis an D-Val<sup>1</sup>, D-Trp<sup>8</sup>-Somatostatin zur Inhibierung der Glucagonsekretion 0,04 bis 0,11 µg/kg und Minute und für die Inhibierung der Insulinsekretion weniger als 0,004 µg/kg und Minute beträgt. Die Mindestdosis an D-Ala<sup>1</sup>, D-Trp<sup>8</sup>-Somatostatin für die Inhibierung sowohl der Glucagon- als auch der Insulinsekretion liegt unter 0,03 µg/kg und Minute.