



CONFÉDÉRATION SUISSE

OFFICE FÉDÉRAL DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

⑤① Int. Cl.²: C 07 C 103/52

⑫ FASCICULE DU BREVET A5



615 662

⑳ Numéro de la demande: 7474/76

㉔ Date de dépôt: 11.06.1976

㉓ Priorité(s): 12.06.1975 US 586436
12.06.1975 US 586437
27.01.1976 US 652945

㉒ Brevet délivré le: 15.02.1980

㉑ Fascicule du brevet
publié le: 15.02.1980

㉑ Titulaire(s):
The Administrators of the Tulane University
Educational Fund, New Orleans/LA (US)

㉒ Inventeur(s):
Andrew Victor Schally, Metairie/LA (US)
David Howard Coy, New Orleans/LA (US)

㉓ Mandataire:
E. Blum & Co., Zürich

⑤④ Procédé de préparation de peptides.

⑤⑦ On prépare les peptides de formule
(pyro)Glu-His-Trp-X-Tyr-Y-Leu-Arg-Pro-Z (I)
dans laquelle X, Y et Z sont définis dans la revendication 1, par enchaînement peptidique des acides aminés protégés, selon la technique dite de support solide. Finalement, on scinde le peptide terminé de son support et l'on enlève les groupes protecteurs.

Les peptides de formule I sont des hormones aptes à libérer l'hormone lutéinisante et l'hormone de stimulation des follicules et peuvent être utilisés comme produits provoquant l'ovulation.

REVENDICATIONS

1. Procédé de préparation d'un peptide de formule

(pyro)Glu-His-Trp-X-Tyr-Y-Leu-Arg-Pro-Z

(I)

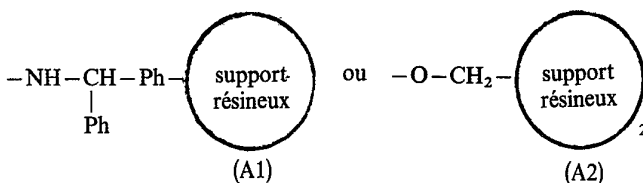
dans laquelle:

- a) X=Ser, Y=D-Trp et Z=Gly-NH₂, ou
 b) X=Ser, Y=D-Phe et Z=Gly-NH₂, ou
 c) X=D-Ser, Y=D-Leu et Z=NHR¹ (R¹=alkyle inférieur),
 ainsi que de leurs sels d'addition d'acide, caractérisé en ce qu'on obtient les composés a) et b) ci-dessus en préparant d'abord un peptide protégé de formule
 R⁸-(pyro)Glu-His(N^{1m}-R⁷)-Trp-X¹-Tyr(R⁵)-Y-Leu-Arg(N^G-R⁴)-Pro-Z²

(II)

dans laquelle:

- a) X¹=Ser(R⁶), Y=D-Trp et Z²=Gly-A, ou
 b) X¹=Ser(R⁶), Y=D-Phe et Z²=Gly-A,
 R⁴, R⁵, R⁶ et R⁷ représentant des groupes protecteurs, et R⁸ étant de l'hydrogène ou groupe protecteur α-amino, et A désignant un groupe de formule



Ph étant un groupement phényle ou phénylène, respectivement, par enchaînement peptidique d'acides aminés dont les groupes qui ne doivent pas réagir sont protégés, selon la synthèse en phase solide commençant avec la glycine protégée en α-amino et fixée au support, et en scindant ensuite les groupes protecteurs et le support A1 simultanément ou, si on utilise le support de formule A2, en scindant d'abord le support et ensuite, dans une étape séparée, les groupes protecteurs; et, pour la préparation du composé c) ci-dessus, on procède comme indiqué en utilisant le support de formule A2 ci-dessus et commençant l'enchaînement peptidique avec la proline protégée en α-amino et fixée au support, la scission du support se faisant par réaction avec un alkylamine inférieure, ce qui introduit le groupe terminal R¹.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le réactif au moyen duquel on scinde les groupes protecteurs est l'acide fluorhydrique.

3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on prépare le peptide de formule

(pyro)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Trp-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂

(Ia)

4. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on prépare le peptide de formule

(pyro)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Phe-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂

(Ib)

5. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on prépare un peptide de formule

(pyro)Glu-His-Trp-D-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-Pro-NHR¹

(Ic)

6. Procédé selon la revendication 1, dans lequel on utilise le support solide de formule A2, caractérisé en ce que le peptide de formule I est dégagé en scindant d'abord le groupe A2 par ammonolyse, l'enlèvement des autres groupes protecteurs se faisant ensuite par réaction avec du sodium et de l'ammoniac liquide ou avec de l'acide fluorhydrique.

7. Procédé selon la revendication 1, dans lequel on utilise le support solide de formule A2, caractérisé en ce que le peptide de formule I est dégagé en scindant d'abord le groupe A2 par transestérification avec un alcool inférieur, puis conversion en l'amide, l'enlèvement des autres groupes protecteurs se faisant ensuite par

réaction avec du sodium et de l'ammoniac liquide ou avec l'acide fluorhydrique.

La présente invention est relative à la préparation de peptides de la formule I:

(pyro)Glu-His-Trp-X-Tyr-Y-Leu-Arg-Pro-Z

(I)

dans laquelle:

- a) X=Ser, Y=D-Trp et Z=Gly-NH₂, ou
 b) X=Ser, Y=D-Phe et Z=Gly-NH₂, ou
 c) X=D-Ser, Y=D-Leu et Z=NHR¹, où R¹ représente un alcoyle inférieur, ainsi qu'à de nouveaux intermédiaires pour la synthèse de ces peptides.

Les peptides de la formule I, dans laquelle:

- a) X=Ser, Y=D-Trp et Z=Gly-NH₂, ou
 b) X=Ser, Y=D-Phe et Z=Gly-NH₂, ou
 c) X=D-Ser, Y=D-Leu et Z=NHR¹
 sont également appelés respectivement:
 a) L-Pyroglutamyl-L-histidyl-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-tryptophyl-L-leucyl-L-arginyl-L-prolylglycinamide, ou
 c) L-pyroglutamyl-L-histidyl-L-tryptophyl-D-séryl-L-tyrosyl-D-leucyl-L-leucyl-L-arginyl-L-propylalcoyl inférieur amide,

et peuvent être désignés respectivement par les abréviations:

- a) [D-Trp⁶]-LH-RH,
 b) [D-Phe⁶]-LH-RH, ou
 b) L-pyroglutamyl-L-histidyl-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-phénylalaninyl-L-leucyl-L-arginyl-L-prolylglycinamide, ou
 c) [D-Ser⁴, D-Leu⁶, des Gly-NH₂¹⁰]-LH-RH (alcoyl inférieur amide).

Les peptides de formule I sont considérés comme étant nouveaux.

L'hormone lutéinisante (LH) et l'hormone de stimulation des follicules (FSH) sont toutes deux des hormones gonadotropes sécrétées par l'hypophyse des êtres humains et des mammifères en général. L'hormone LH et l'hormone FSH stimulent la libération d'œstrogènes au départ des follicules ovariens en cours de maturation et provoquent le processus d'ovulation chez les femmes et les femelles de mammifères. Chez l'homme et chez les mâles des mammifères, l'hormone LH stimule les cellules des glandes interstitielles et, pour cette raison, est appelée hormone de stimulation des glandes interstitielles (ICSH). L'hormone FSH provoque la maturation des follicules ovariens et, en même temps que l'hormone LH, elle joue un rôle important dans les phénomènes cycliques chez les femmes et les femelles. L'hormone FSH provoque le développement des cellules séminales dans les testicules des mâles. Les hormones LH et FSH sont libérées de l'hypophyse sous l'action de l'hormone de libération de LH et de FSH, et il est maintenant pratiquement certain que cette hormone de libération est sécrétée dans l'hypothalamus et atteint l'hypophyse par une voie neurohumorale; voir, par exemple A.V. Schally et consorts, «Recent Progress in Hormone Research», 24, 497 (1968).

On a isolé l'hormone naturelle de libération de LH et de FSH de l'hypothalamus du porc et sa constitution a été mise en évidence par A.V. Schally et consorts, «Biochem. Biophys. Res. Commun.», 43, 393 et 1334 (1971), qui ont proposé la structure de décapeptide:

(pyro)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂.

Cette constitution a été confirmée par synthèse; par exemple, voir H. Matsuo et consorts, «Biochem. Biophys. Res. Commun.», 45, 822 (1971) et R. Geiger et consorts, *ibid.*, 767 (1971).

Ci-après, l'hormone naturelle de libération de LH et de FSH est appelée en abrégé LH-RH.

En raison de l'importance de l'hormone LH-RH à la fois pour les diagnostics et en médecine thérapeutique, on s'est beaucoup

intéressé à la préparation de nouveaux composés présentant des propriétés améliorées par rapport à l'hormone naturelle. Une tentative dans ce sens a été la modification sélective ou le remplacement de restes d'acides aminés de l'hormone LH-RH par d'autres acides aminés. Bien que, dans quelques cas, il se soit présenté que des peptides comportant de telles modifications sont plus actifs que la LH-RH, par exemple: [D-Ala⁶]-LH-RH, A. Arimura et consorts, «Endocrinology», 95, 1174 (1974), [D-Leu⁶]-LH-RH et [D-Leu⁶, desGly-NH₂¹⁰]-LH-RH éthylamide, J.A. Vilchez-Martinez et consorts, «Biochem. Biophys. Res. Commun.», 59, 1226 (1974), les peptides modifiés se sont montrés moins actifs dans la plupart des cas.

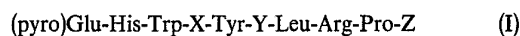
On a maintenant trouvé que:

- le remplacement du fragment glycyle dans la position 6 de la LH-RH par du D-tryptophane, ou
- le remplacement du fragment glycyle dans la position 6 de la LH-RH par de la D-phénylalanine, ou
- le remplacement du fragment L-séryle dans la position 4 de la LH-RH par un fragment D-séryle, le remplacement du fragment glycyle dans la position 6 par un fragment D-leucyle et le remplacement du fragment glycinamide dans la position 10 par un groupe d'alcoyle inférieur amide, donnent un peptide de formule I qui est beaucoup plus actif et d'une durée d'action plus longue que l'hormone LH-RH.

La présente découverte qu'un changement dans l'asymétrie du reste de séryle en position 4, conjointement avec l'introduction d'un reste de D-leucyle en position 6, a pour résultat une activité renforcée et une plus longue durée d'action pour le peptide de formule I, dans laquelle X représente D-Ser, Y représente D-Leu et Z représente NHR¹, est tout à fait surprenante, en raison du fait que, en ce qui concerne la LH-RH, des changements dans l'asymétrie de ses restes d'acides aminés et/ou leur remplacement mènent généralement à un dérivé qui est de loin moins actif que la LH-RH elle-même; voir, par exemple, Y. Hirotsu, «Biochem. Biophys. Res. Commun.», 59, 277 (1974). En outre, en tenant compte de ce qui précède, on a découvert que la [D-Ser⁴]-LH-RH a moins de 5% de l'activité de l'hormone naturelle LH-RH.

Les avantages des présents peptides de formule I sont d'une importance pratique: plus petite dose efficace minimale réduisant les effets secondaires, ainsi que le coût de préparation du composé, et propriété d'action de plus longue durée, réduisant la nécessité d'une administration fréquente.

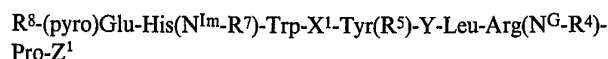
Les composés à préparer suivant la présente invention sont choisis dans le groupe comprenant: les composés répondant à la formule I:



dans laquelle:

- X = Ser, Y = D-Trp et Z = Gly-NH₂, ou
- X = Ser, Y = D-Phe et Z = Gly-NH₂, ou
- X = D-Ser, Y = D-Leu et Z = NHR¹, où R¹ représente un alcoyle inférieur,

ainsi que les sels non toxiques de ces composés, acceptables en pharmacie. Les composés répondant à la formule II:

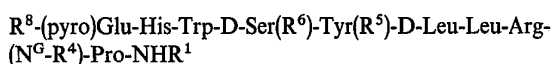


dans laquelle:

- X¹ = Ser(R⁶), Y = D-Trp et Z¹ = Gly-R², ou
- X¹ = Ser(R⁶), Y = D-Phe et Z¹ = Gly-R², ou
- X¹ = D-Ser(R⁶), Y = D-Leu et Z¹ = OR³,

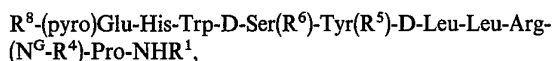
formules dans lesquelles R² est choisi parmi les radicaux amino et O-(alcoyle inférieur), R³ est un alcoyle inférieur, R⁴, R⁵, R⁶ et R⁷ sont des groupes protecteurs pouvant être séparés par un ou plusieurs traitements chimiques qui n'affectent pas l'ensemble (pyro)-Glu-His-Trp-X-Tyr-Y-Leu-Arg-Pro-Z, dans lequel X, Y et Z ont la définition donnée précédemment, et R⁸ représente de l'hydrogène

ou l'un des groupes protecteurs précipités; et les composés répondant à la formule:



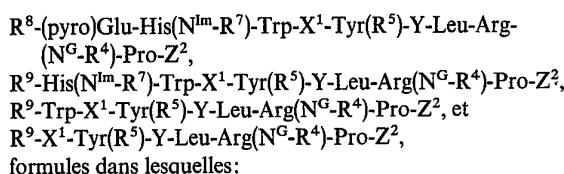
dans laquelle R¹ est un alcoyle inférieur, R⁴, R⁵, R⁶ et R⁸ sont des groupes protecteurs pouvant être séparés par un ou plusieurs traitements chimiques qui n'affectent pas l'ensemble (pyro)-Glu-His-Trp-D-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-Pro-NHR¹, et R⁸ représente de l'hydrogène ou l'un des groupes protecteurs susdits sont des substances se présentant comme intermédiaires du procédé.

En ce qui concerne les composés de la formule II et les composés répondant à la formule:



suivant une forme de réalisation préférée, R¹, R² et R³ ont la définition donnée précédemment, R⁴ est un groupe protecteur pour les atomes d'azote N⁶, N⁶ et N⁶ de l'arginine, ce groupe protecteur étant choisi parmi les radicaux suivants: tosyloxy, nitro, benzyloxycarbonyl et adamantyloxycarbonyl; R⁵ est un groupe protecteur pour le radical hydroxyle de la tyrosine, ce groupe protecteur étant choisi parmi les radicaux 2-bromobenzyloxycarbonyl, benzyle, acétyle, tosyloxy, benzoyloxy, t-butyle, tétrahydropyran-2-yle, trityloxy, 2,4-dichlorobenzyle et benzyloxycarbonyl; R⁶ est un groupe protecteur pour le radical hydroxyle de la sérine et est choisi parmi le groupe défini ci-dessus pour R⁵; R⁷ est un groupe protecteur pour les atomes d'azote d'imidazole de l'histidine, ce groupe protecteur étant choisi parmi le tosyloxy et le dinitrophényloxy; et R⁸ est de l'hydrogène ou un groupe protecteur d'α-amino, ce groupe étant choisi parmi les radicaux suivants: t-butyloxycarbonyl, benzyloxycarbonyl, cyclopentyloxycarbonyl, t-amylloxycarbonyl et d-isobornyloxycarbonyl.

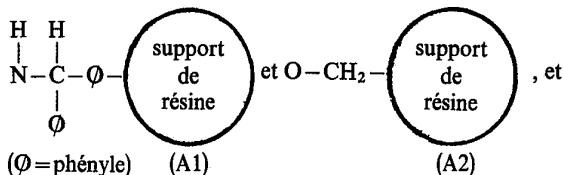
Dans le présent procédé, il se forme également des intermédiaires liés à un support de résine solide. Ces intermédiaires peuvent être représentés par les formules:



formules dans lesquelles:

- X¹ = Ser(R⁶), Y = D-Trp et Z² = Gly-A, ou
- X¹ = Ser(R⁶), Y = D-Phe et Z² = Gly-A, ou
- X¹ = D-Ser(R⁶), Y = D-Leu et Z² = A².

Dans ces formules, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷ et R⁸ ont la définition donnée précédemment, R⁹ est un groupe protecteur d'α-amino, connu en pratique dans la synthèse graduelle des polypeptides, des groupes protecteurs appropriés de ce genre étant énumérés ci-après, et A et A² sont des liaisons de fixation utilisées dans une synthèse en phase solide avec un support de résine solide. A est choisi parmi:



Le procédé selon l'invention est défini par la revendication 1 indépendante.

Dans la présente description, l'expression alcoyle inférieur désigne les radicaux alcoyles comportant de 1 à 3 atomes de carbone et elle englobe le méthyle, l'éthyle, le propyle et l'isopropyle.

N^G désigne les atomes d'azote de chaîne latérale de l'arginine.

N^{Im} désigne les atomes d'azote d'imidazole de l'histidine.

Le symbole φ désigne le phényle.

D'une manière générale, les abréviations utilisées dans le cas présent pour désigner les aminoacides et les groupes protecteurs ont été fondées sur les recommandations de la IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, voir «Biochemistry», II, 1726 (1972). Par exemple, t-Boc représente le t-butyloxy-carbonyl, Z représente le benzyloxycarbonyl, Tos représente le tosyl, 2-Br-Cbz représente le 2-bromobenzyloxycarbonyl, Bzl représente le benzyle, et Dnp représente le 2,4-dinitrophényle. Les abréviations utilisées ici pour les divers aminoacides sont: Arg, arginine; Gly, glycine; His, histidine; Leu, leucine; Pro, proline; (pyro)Glu, 5-oxoproline (acide pyroglutamique); Ser, sérine; Trp, tryptophane et Tyr, tyrosine. Tous les aminoacides décrits ici sont de la série L, à moins d'indications contraires, notamment D-Ser est un reste de D-séryle, D-Leu est un reste de D-leucyle, D-Phe est un reste de D-phénylalanyle et D-Trp est un reste de D-tryptophyle.

On peut obtenir les peptides de formule I ci-dessus sous la forme de sels d'addition d'acide. Des exemples de sels sont les sels avec des acides organiques, par exemple les acides acétique, lactique, succinique, benzoïque, salicylique, méthanesulfonique ou toluènesulfonique, ainsi qu'avec des acides polymères, comme l'acide tannique ou la carboxyméthylcellulose, et des sels avec des acides minéraux, tels que les acides halogénhydriques, par exemple l'acide chlorhydrique, ou encore l'acide sulfurique ou l'acide phosphorique. Si on le désire, on peut convertir un sel d'addition d'acide particulier en un autre sel d'addition d'acide, par exemple un sel avec un acide non toxique, acceptable en pharmacie, par traitement avec la résine appropriée d'échange d'ions, de la manière décrite par R.A. Boissonnas et consorts, «Helv. Chim. Acta», 43, 1349 (1960). Des résines d'échange d'ions appropriées sont les résines échangeuses de cations à base de cellulose, par exemple la carboxyméthylcellulose, ou les résines échangeuses de cations à base de dextrane chimiquement modifié réticulé, par exemple les résines du type Sephadex-C, et les résines échangeuses d'anions fortement basiques, par exemple celles énumérées par J.P. Greenstein et M. Winitz dans «Chemistry of the Amino Acids», John Wiley and Sons, Inc., New York et Londres, 1961, vol. 2, p. 1456.

Les peptides de formule I et leurs sels présentent une activité intéressante et de longue durée à titre d'hormones de libération de LH et de FSH.

L'activité intéressante en tant qu'hormone de libération de LH et de FSH et la propriété de longue durée d'action des composés de la présente invention ont été démontrées par des procédés pharmacologiques traditionnels. A titre d'exemple, ces activités peuvent être démontrées par les essais décrits par A. Arimura et consorts, «Endocrinology», 95, 1174 (1974). En suivant le procédé décrit dans cette publication, les résultats de libération de LH, obtenus sur des rats ayant reçu une dose du composé (50 ng, voie sous-cutanée), montrent que les peptides de formule I atteignent une activité maximale environ 2 h après l'administration de la dose, et qu'une activité importante est toujours présente sur une période allant jusqu'à 6 h; par contre, avec la même dose de l'hormone naturelle LH-RH (50 ng, voie sous-cutanée), l'activité maximale est atteinte après environ 15 mn et aucun effet de l'injection ne s'observe encore après 1 h. En outre, les taux intégrés de LH sur une période de 6 h montrent que les composés de formule I: [D-Ser⁴, D-Leu⁶, desGly-NH₂¹⁰]-LH-RH éthylamide, [D-Phe⁶]-LH-RH et [D-Trp⁶]-LH-RH, sont respectivement 21 fois, 20 fois et 12 fois plus actifs en ce qui concerne la libération de l'hormone LH que l'hormone naturelle LH-RH. Les résultats concernant la libération de l'hormone FSH, après des injections des composés de la formule I, montrent que les composés: [D-Ser⁴, D-Leu⁶, desGly-NH₂¹⁰]-LH-RH éthylamide, [D-Phe⁶]-LH-RH et [D-Trp⁶]-LH-RH sont respectivement environ 11 fois, 20 fois et 20 fois plus actifs que l'hormone naturelle LH-RH à la même dose (50 ng).

En outre, l'activité des composés de la formule I a été démontrée sur l'être humain.

Des analyses (radio-immunisation) des taux de LH dans le sérum, après administration intranasale, montrent que la dose efficace minimale de LH-RH est d'environ 2,0 mg, tandis qu'un degré équivalent d'activité s'obtient avec une dose de 0,5 mg de [D-Trp⁶]-LH-RH. Dans ce cas, les composés ont été administrés à des êtres humains dans une solution saline normale. En ce qui concerne la libération de FSH chez l'être humain, des études comparatives entre la LH-RH et la [D-Trp⁶]-LH-RH donnent des résultats particulièrement remarquables. Une administration intranasale allant jusqu'à 2 mg de LH-RH n'a que peu ou pas d'effet sur les taux de FSH dans le sérum, ce que l'on a mesuré par une analyse à radio-immunisation, voir H.G. Dahlen et consorts, «Horm. Metab. Res.», 6, 510 (1974); par contre, à 0,5 mg sous les mêmes conditions, la [D-Trp⁶]-LH-RH libère des quantités importantes de FSH, c'est-à-dire des taux allant de 0,3 à plus de 1,5 mIU/ml. On comprendra aisément qu'un composé qui est capable de libérer la FSH de façon efficace a de nombreuses applications thérapeutiques; voir, par exemple, H.G. Dahlen et consorts, citation précédente.

Les propriétés de libération de LH et de FSH des peptides de la formule I, qui, à leur tour, provoquent l'ovulation chez les animaux, rendent ces peptides intéressants en médecine vétérinaire et pour l'élevage des animaux. Il est souvent désirable de synchroniser l'œstrus chez les animaux, par exemple chez le bétail en général, les moutons ou les porcs, soit pour pouvoir assurer l'appareillage des femelles d'un groupe donné avec un mâle de la qualité génétique désirée, soit pour pouvoir réaliser une insémination artificielle sur un nombre maximal de femelles, dans les deux cas sur une période de temps relativement courte. Antérieurement, on agissait, dans les deux cas ci-dessus, en administrant aux animaux un agent inhibiteur d'ovulation, en supprimant cette administration peu avant la date choisie pour l'appareillage ou l'insémination artificielle, et en comptant ensuite sur la production naturelle de LH et de FSH pour provoquer l'ovulation et produire l'œstrus, ou encore en administrant des hormones gonadotropes. Cependant, cette manière de procéder n'était pas tout à fait satisfaisante, car l'ovulation à un moment prédéterminé ne se développe jamais chez tous les animaux en même temps, mais uniquement chez une certaine proportion d'entre eux, lorsqu'on n'utilise pas d'hormones gonadotropes. D'autre part, le coût élevé de ces dernières hormones et les effets secondaires rencontrés lors de leur utilisation ont rendu cette méthode impraticable. Il est maintenant possible d'obtenir une synchronisation pratiquement totale de l'ovulation et de l'œstrus, en traitant les animaux d'un groupe donné, d'abord avec un inhibiteur d'ovulation qui est ensuite supprimé, et en administrant ensuite un peptide de formule I peu avant la période prédéterminée, prévue pour l'appareillage ou l'insémination artificielle, de manière à obtenir l'ovulation et l'œstrus au cours de cet intervalle de temps. Le délai avant le début de l'ovulation et de l'œstrus, après l'administration d'un tel peptide, varie avec les espèces d'animaux, et l'intervalle optimal de temps doit être choisi pour chaque espèce. A titre d'exemple, chez des rongeurs comme les rats ou les hamsters, l'ovulation se produit dans les 18 j après l'administration d'un peptide suivant l'invention.

La méthode décrite ci-dessus pour obtenir une ovulation et un œstrus au cours d'un intervalle de temps prédéterminé avec précision, de manière à assurer un appareillage satisfaisant, est particulièrement importante pour les éleveurs de chevaux de course et d'animaux d'exposition, c'est-à-dire lorsque les frais à prévoir pour les services d'un mâle particulier s'élèvent souvent à des sommes très élevées.

Les peptides de formule I sont également intéressants pour augmenter le nombre de naissances par portée chez les animaux, en particulier chez le bétail en général, les moutons ou les porcs. A cet effet, on administre le peptide en une série de doses parentérales, de préférence par des injections intraveineuses ou sous-cutanées, à raison d'environ 0,1 à 10 µg par kilo de poids de corps par jour, et ce de 96 à 12 h avant l'œstrus attendu et l'accouplement ultérieur. Une

injection de départ de 1000 à 5000 unités d'hormone gonadotrope de sérum de juments gravides peut également être prévue 1 à 4 j avant l'injection précédente du peptide. Un traitement similaire, avec ou sans injection préliminaire, est aussi intéressant pour provoquer la puberté chez les animaux de la ferme.

Lorsqu'on utilise un peptide de formule I dans le but de provoquer l'ovulation et l'œstrus ou dans le but d'amorcer la puberté chez les animaux à sang chaud, en particulier chez les rongeurs, comme les rats ou les hamsters, ou chez le bétail, on administre ce peptide à l'organisme, de préférence par voie parentérale, en combinaison avec un véhicule ou support liquide ou solide, acceptable en pharmacie. La proportion du peptide est déterminée par sa solubilité dans le véhicule donné, par la voie d'administration choisie, et par la pratique biologique traditionnelle. Pour une administration parentérale à des animaux, on utilise le peptide en solution aqueuse stérile qui peut également contenir d'autres produits dissous, tels que des tampons ou des agents de conservation, ainsi qu'une quantité suffisante de glucose ou de sels acceptables en pharmacie pour rendre la solution isotonique. La dose variera avec la forme d'administration et avec l'espèce particulière d'animal à traiter, et elle sera de préférence maintenue à un niveau de 0,1 à 10 µg par kilo de poids de corps. Cependant, une dose de l'ordre d'environ 1 à environ 5 µg par kilo de poids de corps est employée de façon particulièrement avantageuse pour atteindre des résultats efficaces.

On peut également administrer des peptides de formule I sous l'une des formes à longue durée, à libération lente ou dépôt, que l'on décrit par la suite, de préférence par injection intramusculaire ou par implantation. Ces formes de doses sont conçues pour libérer environ 0,1 à environ 10 µg par kilo de poids de corps par jour.

Les peptides de formule I sont également intéressants en médecine humaine. A titre d'exemple, la gonadostimuline chorionique humaine (HCG), qui contient principalement l'hormone LH et une certaine quantité d'hormone FSH, s'utilise depuis plus de 30 ans pour traiter certains troubles endocrinologiques, tels que des troubles du cycle menstruel, l'aménorrhée, l'absence de développement des caractéristiques sexuelles secondaires et la stérilité chez les femmes, ou encore certains cas d'hypogonadisme, de retard de puberté, de cryptorchidie et d'impuissance non psychogène chez l'homme. Plus tard, on a également traité la stérilité chez la femme par des gonadostimulines humaines de femmes ménopausées (HMG) qui contiennent principalement l'hormone FSH, avec ensuite un traitement avec l'hormone HCG. L'un des désavantages du traitement de la stérilité chez la femme avec la HCG ou avec la HMG suivie par la HCG est constitué par le fait qu'un tel traitement a souvent pour résultat une suroovulation et des naissances multiples indésirables, probablement en raison de l'impossibilité d'administrer seulement les quantités exactes de FSH et de LH nécessaires pour l'ovulation. L'administration d'un peptide obtenu suivant l'invention évite le désavantage précédent, car le composé provoque la libération de LH et de FSH par l'hypophyse, uniquement en les quantités exactes qui sont nécessaires pour une ovulation normale. Pour cette raison, un peptide suivant l'invention est non seulement intéressant dans le but ci-dessus, mais il est également intéressant chez la femme pour le traitement des troubles du cycle menstruel, de l'aménorrhée, de l'hypogonadisme et de l'absence de développement des caractéristiques sexuelles secondaires.

Les peptides obtenus suivant l'invention sont en outre utiles en contraception. A titre d'exemple, lorsqu'on administre le peptide à une femme très tôt au cours du cycle menstruel, de l'hormone LH est libérée à ce moment et provoque une ovulation prématurée. L'ovule immature est incapable d'une fécondation ou bien, si une fécondation devait néanmoins se produire, il est très improbable que l'ovule fécondé soit implanté, car l'équilibre œstrogène-progesterone, nécessaire pour la préparation de l'endomètre, n'existe pas et l'endomètre n'est pas dans l'état requis pour l'implantation.

D'autre part, lorsque le peptide est administré vers la fin du cycle, l'endomètre est rompu et les règles se produisent.

En outre, les peptides obtenus suivant l'invention sont également intéressants dans la contraception par la méthode dite des rythmes qui a toujours été relativement peu fiable en raison de l'impossibilité de la prédétermination de l'ovulation chez la femme avec le degré requis de précision. L'administration d'un peptide suivant l'invention à mi-cycle, c'est-à-dire à peu près au moment normalement attendu de l'ovulation, provoque l'ovulation peu après et rend la méthode des rythmes à la fois sûre et efficace.

Les peptides de la formule I sont également utiles comme moyens de diagnostic pour faire la distinction entre les troubles ou les lésions de l'hypothalamus et de l'hypophyse chez la femme. Lorsqu'on administre le peptide à une patiente pour laquelle on suppose de tels troubles ou lésions et que l'on observe ensuite une élévation du taux de LH, il s'agit là d'une bonne indication permettant de conclure que l'hypothalamus est la cause du trouble et que l'hypophyse est intacte. Par contre, lorsqu'on ne remarque aucune élévation du taux de LH après l'administration du peptide, on peut alors diagnostiquer un trouble ou une lésion de l'hypophyse, avec un degré élevé de fiabilité.

Chez l'homme, l'administration d'un peptide de la formule I apporte les quantités de LH (ou de ICSH) et de FSH nécessaires pour le développement sexuel normal dans les cas d'hypogonadisme et de retard de puberté, cette administration étant également intéressante dans le traitement de la cryptorchidie. En outre, l'hormone FSH libérée par l'administration du peptide stimule le développement des cellules séminales des testicules, et le peptide est intéressant dans le traitement de l'impuissance psychogène et de l'impuissance non psychogène.

Lorsqu'on utilise en médecine humaine les peptides de formule I, de préférence sous la forme d'un sel d'addition d'acide, on les administre à l'organisme, soit par injection intraveineuse, sous-cutanée ou intramusculaire, soit par une administration sous-linguale, nasale ou vaginale, sous forme de combinaisons formées conjointement avec un véhicule ou support acceptable du point de vue pharmaceutique.

Pour l'administration par la voie nasale sous forme de gouttes ou de pulvérisations, on préfère utiliser un peptide de formule I en solution dans un véhicule aqueux stérile pouvant contenir également d'autres produits dissous, tels que des tampons ou des agents de conservation, ainsi que des quantités suffisantes de glucose ou de sels acceptables en pharmacie pour rendre la solution isotonique. Les doses par la voie intranasale sont de 0,1 à 50 µg/kg, de préférence de 0,5 à 10 µg/kg.

On peut également administrer les peptides de formule I sous forme de poudres ou d'insufflations par la voie nasale ou la voie vaginale. A cet effet, on administre le peptide sous une forme solide finement subdivisée, en même temps qu'un véhicule solide acceptable en pharmacie, par exemple un polyéthylène glycol finement subdivisé (Carbowax 1540), du lactose finement subdivisé, ou encore de préférence pour l'administration vaginale, de la silice très finement subdivisée (Cab-O-Sil). Des compositions de ce genre peuvent contenir également d'autres excipients sous une forme solide finement subdivisée, tels que des agents de conservation, des tampons ou des agents tensio-actifs.

Pour l'administration sous-linguale ou vaginale, on préfère formuler les peptides de formule I en doses solides, par exemple des comprimés sous-linguaux ou des ovules ou suppositoires vaginaux, avec des quantités suffisantes d'excipients solides, comme l'amidon, le lactose, certains types d'argiles, des tampons, et des agents de lubrification, de désintégration ou tensio-actifs, ou encore avec des excipients semi-solides couramment utilisés dans la formulation de suppositoires. Des exemples d'excipients de ce genre peuvent se retrouver dans les manuels pharmaceutiques classiques, par exemple dans «Pharmaceutical Sciences» de Remington, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvanie, 1970.

La dose des peptides de formule I variera avec la forme d'administration et avec le patient particulier en traitement. Généralement, on amorce le traitement avec de faibles doses, sensiblement inférieures à la dose optimale du composé. Ensuite, on augmente cette dose par petites quantités jusqu'à ce que l'on atteigne l'effet optimal pour le cas considéré. D'une manière générale, on administre les peptides de formule I de la manière la plus avantageuse à un taux de concentration qui apportera, d'une manière générale, une libération efficace de la LH et/ou de la FSH, sans pour autant provoquer d'effets secondaires nuisibles ou désagréables, ce taux étant de préférence de l'ordre d'environ 0,01 à environ 100 µg par kilo de poids de corps, bien que cette gamme de doses soit sujette à variations comme on l'a mentionné précédemment. Cependant, un taux de dosage du peptide de la formule I, dans laquelle:

a) X=Ser, Y=D-Trp et Z=Gly-NH₂, ou

b) X=Ser, Y=D-Phe et Z=Gly-NH₂

de l'ordre d'environ 0,5 µg à environ 5,0 µg par kilo de poids de corps, et du peptide de formule I, dans laquelle:

c) X=D-Ser, Y=D-Leu et Z=NHR¹

de l'ordre d'environ 0,1 à environ 10 µg par kilo de poids de corps est le plus avantageux pour arriver à des résultats efficaces.

Il est souvent désirable d'administrer les peptides de formule I de manière continue sur des périodes prolongées de temps sous la forme de doses à longue durée d'action, à libération lente ou dépôt. De telles formes de dosage peuvent contenir un sel du composé, acceptable en pharmacie, ayant un faible degré de solubilité dans les fluides du corps, par exemple des sels avec l'acide pamoïque ou tannique ou avec de la carboxyméthylcellulose, ou bien elles peuvent contenir les peptides sous la forme d'un sel soluble dans l'eau, en même temps qu'un véhicule protecteur empêchant une libération rapide. Dans ce dernier cas, on peut formuler, par exemple, les peptides avec une gélatine partiellement hydrolysée, non antigène, sous la forme d'un liquide visqueux; ou bien ces peptides peuvent être adsorbés sur un véhicule solide acceptable en pharmacie, par exemple de l'hydroxyde de zinc avec ou sans protamine, et peuvent être administrés en suspension dans un véhicule liquide acceptable en pharmacie; ces peptides peuvent encore être formulés en gels ou suspensions avec un hydrocolloïde non antigène, protecteur, par exemple de la sodiumcarboxyméthylcellulose, de la polyvinylpyrrolidone, de l'alginate de sodium, de la gélatine, des acides polygalacturoniques, par exemple de la pectine, ou certains mucopolysaccharides, en même temps que des agents tensio-actifs, des agents de conservation ou des véhicules liquides, aqueux ou non aqueux, acceptables en pharmacie. On peut trouver des exemples de formulations de ce genre dans les manuels pharmaceutiques traditionnels, par exemple dans le manuel «Pharmaceutical Sciences» de Remington, cité précédemment. Des préparations à longue durée d'action, à libération lente, des peptides suivant l'invention peuvent également s'obtenir par micro-encapsulation dans une matière d'enrobage acceptable en pharmacie, par exemple de la gélatine, de l'alcool polyvinylique ou de l'éthylcellulose. D'autres exemples de matières d'enrobage et de procédés utilisés pour la micro-encapsulation sont décrits par J.A. Herbig dans «Encyclopedia of Chemical Technology», vol. 13, 2^e éd., Wiley, New York, 1967, pp. 436-456. Des formulations de ce genre, ainsi que des suspensions de sels des peptides, qui ne sont que faiblement solubles dans les fluides du corps, sont conçues pour libérer environ 0,1 à environ 50 µg de l'hormone par kilo de poids de corps par jour, et on les administre de préférence par injection intramusculaire. A titre de variante, certaines des formes solides de dosage, énumérées précédemment, par exemple certains sels faiblement solubles dans l'eau ou certaines dispersions de sels des peptides dans un support solide ou encore des produits d'adsorption de ces sels sur ces supports, comme des dispersions dans un hydrogel neutre d'un polymère de méthacrylate d'éthylène-glycol ou de monomères similaires réticulés, comme décrit dans le brevet des Etats-Unis d'Amérique N° 3551556 délivré le 29 décembre 1970 à K. Kliment et consorts, peuvent également se

préparer sous la forme d'implants libérant à peu près les mêmes quantités que celles citées précédemment, ces implants pouvant être utilisés par voie sous-cutanée ou intramusculaire.

On peut également obtenir des effets de libération lente sur des périodes prolongées de temps en administrant les peptides de l'invention sous la forme d'un sel d'addition d'acide dans un dispositif intravaginal ou dans un implant temporaire, par exemple dans un réceptacle formé d'un polymère de silicone non irritant, comme un polysiloxane, par exemple du Silastic, ou d'un hydrogel neutre d'un polymère tel que décrit précédemment, présentant le degré requis de perméabilité pour libérer environ 0,1 à environ 50 µg par kilo de poids de corps par jour. De telles formes de dosage sous la forme d'un dispositif intravaginal ou d'un implant, en vue d'une administration très prolongée, présentent l'avantage qu'on peut les retirer lorsqu'on le désire, pour interrompre ou terminer le traitement.

Dans la synthèse des peptides de formule I suivant la présente invention, on suivra les règles suivantes dans le choix d'un groupe particulier, protecteur de la chaîne latérale:

a) le groupe protecteur doit être stable vis-à-vis du réactif et sous les conditions de réaction choisies pour enlever le groupe protecteur d' α -amino à chaque phase de la synthèse;

b) le groupe protecteur doit conserver ses propriétés de protection (c'est-à-dire ne pas se séparer sous les conditions de la combinaison), et

c) le groupe protecteur de chaîne latérale doit être séparable à la fin de la synthèse contenant la séquence désirée d'acides aminés, sous des conditions de réaction qui ne modifient pas la chaîne de peptide.

En ce qui concerne R⁹, des groupes protecteurs convenables du radical α -amino sont: 1) des groupes protecteurs d'uréthane aliphatiques, illustrés par: t-butyloxycarbonyl, diisopropylméthoxycarbonyl, biphenylisopropylloxycarbonyl, isopropylloxycarbonyl, t-amylloxycarbonyl, éthoxycarbonyl, allyloxycarbonyl; 2) des groupes protecteurs du type cycloalkyluréthane, illustrés par: cyclopentylloxycarbonyl, adamantylloxycarbonyl, d-isobornylloxycarbonyl, cyclohexylloxycarbonyl, nitrophenylsulfényle, tritylsulfényle, α,α -diméthyl-3,5-diméthoxybenzyloxycarbonyl et trityle. Le groupe protecteur d' α -amino préféré pour R⁹ est choisi dans le groupe comprenant: t-butyloxycarbonyl, cyclopentylloxycarbonyl, t-amylloxycarbonyl, d-isobornylloxycarbonyl, o-nitrophenylsulfényle, biphenylisopropylloxycarbonyl, et α,α -diméthyl-3,5-diméthoxybenzyloxycarbonyl.

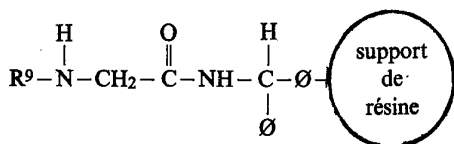
On prépare les peptides de formule I suivant l'invention en utilisant une synthèse en phase solide, que l'on illustrera ci-après par diverses formes de mise en œuvre, suivant lesquelles on prépare des peptides spécifiques de formule I:

a) et b) *Peptides de formule I dans laquelle:*

a) X=Ser, Y=D-Trp et Z=Gly-NH₂, ou

b) X=Ser, Y=D-Phe et Z=Gly-NH₂.

La synthèse en phase solide des peptides de formule I, définis sous a) et b) ci-dessus, est amorcée à l'extrémité C-terminale du peptide, en utilisant une résine protégée en α -amino. On prépare une telle matière de départ en attachant une glycine protégée en α -amino à une résine de banzhydramine, une résine chlorométhylée ou une résine hydroxyméthylée, la première étant préférée. La préparation d'une résine de banzhydramine a été décrite par P. Rivaille et consorts, «Helv. Chim. Acta», 54, 2772 (1971) et la préparation de la résine hydroxyméthylée a été décrite par M. Bodanszky et J.T. Sheehan, «Chem. Ind.» (London), 38, 1597 (1966). On peut disposer d'une résine chlorométhylée sur le marché en provenance de la société Bio Rad Laboratories, Richmond, Californie. Lorsqu'on utilise la résine de banzhydramine, il se forme une liaison d'accrochage d'amide avec la glycine protégée en α -amino, et ce de la façon suivante:



Cela permet l'obtention directe de la fonction amide C-terminale après que la séquence des aminoacides a été complétée dans la synthèse, par séparation du support de résine du peptide lié, pour former l'amide de glycine à la partie C-terminale du décapeptide désiré. Dans ce cas, l'utilisation d'acide fluorhydrique pour séparer le support de résine enlève également les groupes protecteurs de chaîne latérale pour donner le décapeptide correspondant de formule I, dans laquelle:

- a) X=Ser, Y=D-Trp et Z=Gly-NH₂, ou
b) X=Ser, Y=D-Phe et Z=Gly-NH₂.

Lorsqu'on utilise les autres résines, la liaison d'accrochage est le groupe benzyloxy tel qu'illustré précédemment. Dans ce cas, un procédé commode pour convertir le peptide protégé lié en l'amide C-terminal consiste en l'ammonolyse du peptide protégé à partir de la résine et en la séparation des groupes protecteurs de l'amide résultant par traitement avec du sodium et de l'ammoniac liquide ou par une séparation à l'acide fluorhydrique. Un autre procédé consiste à provoquer la séparation par une transestérification avec un alcool inférieur, de préférence du méthanol ou de l'éthanol, en présence de triéthylamine, avec ensuite conversion de l'ester résultant en un amide et enfin suppression de la protection, comme décrit précédemment. Voir également J.M. Stewart et J.D. Young, «Solid Phase Peptide Synthesis», W.H. Freeman & Co., San Francisco, 1969, pp. 40-49.

D'une manière plus particulière, dans une forme de réalisation de la présente invention, une glycine protégée en α -amino, de préférence de la t-butyloxycarbonylglycine, est combinée à une résine de benzhydrylamine à l'aide du composé activant du groupe carboxyle, de préférence du dicyclohexylcarbodiimide. Après la combinaison de la glycine protégée en α -amino avec le support de résine, le groupe protecteur en α -amino est séparé, par exemple en utilisant de l'acide trifluoroacétique dans du chlorure de méthylène, de l'acide trifluoroacétique seul, ou de l'acide chlorhydrique dans du dioxanne. La suppression de la protection est réalisée à une température comprise entre 0°C et la température ambiante. D'autres réactifs classiques de séparation et d'autres conditions pour l'enlèvement des groupes protecteurs particuliers en α -amino peuvent s'utiliser comme décrit par E. Schroder et K. Lubke, «The Peptides», vol. I, Academic Press, New York, 1965, pp. 72-75. Après séparation du groupe protecteur en α -amino, les aminoacides restants, protégés en α -amino, sont combinés pas à pas dans l'ordre désiré pour obtenir le peptide voulu. Chaque aminoacide protégé est amené à la réaction en phase solide en un excès d'environ 3 fois, et la combinaison est réalisée dans un milieu de chlorure de méthylène ou formé par un mélange de diméthylformamide dans du chlorure de méthylène. Dans les cas où une combinaison incomplète se développe, le procédé de combinaison est répété avant séparation du groupe protecteur en α -amino, avant la combinaison de l'acide aminé suivant avec l'acide aminé ou le peptide lié à un polymère. Le succès de la réaction de combinaison à chaque stade de la synthèse est surveillé par la réaction à la ninhydrine, de la façon décrite par E. Kaiser et consorts, «Analyt. Biochem.», 34, 595 (1970).

Après la synthèse de la séquence désirée d'acides aminés, on sépare le peptide du support de résine par traitement avec un réactif, tel que de l'acide fluorhydrique, qui non seulement sépare le peptide de la résine, mais sépare également tous les groupes protecteurs restants de chaîne latérale et le groupe protecteur en α -amino, s'il est présent, existant sur le reste d'acide pyroglutamique, dans le cas où on a utilisé la résine de benzhydrylamine pour obtenir directement le peptide de formule I, tel que défini sous a) ou b).

Lorsqu'on utilise une résine chlorométhylée, le peptide peut être séparé de la résine par transestérification avec un alcool inférieur, de préférence du méthanol ou de l'éthanol, puis le produit récupéré

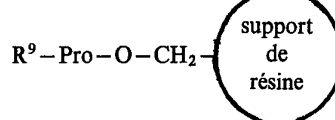
est chromatographié sur gel de silice et la fraction recueillie est soumise à un traitement avec de l'ammoniac pour convertir l'ester d'alcyle inférieur, de préférence l'ester méthylique ou éthylique, en l'amide C-terminal. Les groupes protecteurs de chaîne latérale sont alors séparés par les procédés décrits précédemment, par exemple par traitement avec du sodium dans de l'ammoniac liquide ou par de l'acide fluorhydrique.

En plus des groupes protecteurs R⁷ décrits précédemment pour les atomes d'azote d'imidazole de l'histidine, R⁷ peut aussi consister en le 2,2,2-trifluoro-1-benzoyloxycarbonylaminoéthyle et en le 2,2,2-trifluoro-1-t-butyloxycarbonylaminoéthyle.

c) Peptide de formule I, dans laquelle:

c) X=D-Ser, Y=D-Leu et Z=NHR¹

La synthèse en phase solide du peptide de formule I, dans laquelle X=D-Ser, Y=D-Leu et Z=NHR¹, est amorcée à l'extrémité C-terminale du peptide, en utilisant une résine de proline protégée en α -amino. On prépare une telle matière de départ en attachant une proline protégée en α -amino à une résine chlorométhylée ou une résine hydroxyméthylée, la première étant préférée. La préparation d'une résine hydroxyméthylée a été décrite par M. Bodansky et J.T. Sheehan, «Chem. Ind.» (London), 38, 1597 (1966). Une résine chlorométhylée est disponible sur le marché en provenance de la société Bio Rad Laboratories, Richmond, Californie. Lorsqu'on utilise la résine chlorométhylée, il se forme un groupe d'accrochage d'ester avec la proline protégée en α -amino, et ce de la façon suivante:



Un procédé commode pour la conversion du peptide protégé lié en l'(alcyl inférieur)amide C-terminal consiste en la séparation du peptide protégé à partir de la résine par un traitement avec une alcyl inférieur amine, voir D.H. Coy et consorts, «Biochem. Biophys. Res. Commun.», 57, 335 (1974), pour obtenir l'(alcyl inférieur)amide de peptide protégé correspondant. Ensuite, les groupes protecteurs de l'(alcyl inférieur)amide de peptide résultant sont séparés par traitement avec du sodium et de l'ammoniac liquide ou de préférence par de l'acide fluorhydrique pour donner le peptide correspondant de formule I, décrit ci-dessus sous c), suivant l'invention. Un autre procédé consiste en une séparation par transestérification avec un alcool inférieur, de préférence du méthanol ou de l'éthanol, en présence de triéthylamine, avec ensuite conversion de l'ester résultant en l'(alcyl inférieur)amide correspondant, puis suppression de la protection comme décrit précédemment. Voir également J.M. Stewart et J.D. Young, «Solid Phase Peptide Synthesis», W.H. Freeman & Co., San Francisco, 1969, pp. 40-49.

De manière plus particulière, suivant une forme de réalisation de la présente invention, une proline protégée en α -amino, de préférence de la t-butyloxycarbonylproline, est combinée à une résine chlorométhylée à l'aide d'un catalyseur, de préférence du bicarbonate de césium ou de la triéthylamine. Après la combinaison de la proline protégée en α -amino avec le support de résine, le groupe protecteur en α -amino est séparé, par exemple en utilisant de l'acide trifluoroacétique dans du chlorure de méthylène, de l'acide trifluoroacétique seul ou de l'acide chlorhydrique dans du dioxanne. La suppression de la protection est réalisée à une température comprise entre environ 0°C et la température ambiante. D'autres agents classiques de séparation et d'autres conditions pour l'enlèvement des groupes protecteurs en α -amino peuvent s'utiliser comme décrit par E. Schroder et K. Lubke, «The Peptides», vol. 1, Academic Press, New York, 1965, pp. 72-75. Après séparation du groupe protecteur en α -amino, les aminoacides protégés en α -amino restants sont combinés pas à pas dans l'ordre désiré pour obtenir le composé

de formule I illustré précédemment sous c). Chaque aminoacide protégé est amené à la réaction en phase solide en un excès d'environ 3 fois, et on réalise la combinaison dans un milieu de chlorure de méthylène ou un mélange de diméthylformamide et de chlorure de méthylène. Dans les cas où il se produit une combinaison incomplète, le procédé de combinaison est répété avant séparation du groupe protecteur en α -amino, avant la combinaison de l'acidoacide suivant avec la réaction en phase solide. Le développement de la réaction de combinaison à chaque stade de la synthèse est surveillé par la réaction à la ninhydrine, comme décrit par E. Kaiser et consorts, «*Analyt. Biochem.*», 34, 595 (1970).

Après synthèse de la séquence désirée d'acidoacides, le peptide protégé est séparé du support de résine par traitement avec une (alcoyl inférieur)amine pour donner l'(alcoyl inférieur)amide de peptide protégé correspondant et, dans le cas où on a utilisé du dinitrophényle ou du tosylo comme groupe protecteur pour le reste d'histidyle, le groupe protecteur dinitrophényle ou tosylo est également séparé durant le traitement avec l'(alcoyl inférieur)amine. Le peptide peut également être séparé de la résine par transestérification avec un alcool inférieur, de préférence du méthanol ou de l'éthanol, puis le produit récupéré est purifié par chromatographie sur gel de silice et la fraction recueillie est soumise à un traitement avec une (alcoyl inférieur)amine pour convertir l'ester d'alcoyle inférieur, de préférence l'ester méthylque ou éthylique, en l'(alcoyl inférieur)amide C-terminal (il y a lieu de noter que le groupe dinitrophényle ou tosylo, s'il est présent sur le reste d'histidyle, sera également séparé). Les groupes protecteurs de chaîne latérale restants de l'éthylamide protégé sont alors séparés par des procédés décrits précédemment, par exemple par traitement avec du sodium dans de l'ammoniac liquide ou par de l'acide fluorhydrique pour donner le nonapeptide de formule I illustré précédemment sous c).

Les exemples suivants illustreront encore plus complètement l'invention.

Exemple 1

L-Pyroglutamyl-L-histidyl(tosyl)-L-tryptophyl-L-séryl(benzyl)-L-tyrosyl(2-bromobenzyloxycarbonyl)-D-tryptophyl-L-leucyl-L-arginyl(tosyl)-L-prolylglycyl-résine de benzhydrylamine (R^8 -(pyro)Glu-His-(N^{tm} - R^7)-Trp-Ser(R^6)-Tyr(R^5)-D-Trp-Leu-Arg(N^G - R^4)-Pro-Gly-A; R^4 = Tos, R^5 = 2-Br-Cbz, R^6 = Bzl, R^7 = Tos, R^8 = H et A = résine de benzhydrylamine)

On place une résine de benzhydrylamine (1,25 g, 1 mmole) dans le récipient de réaction d'un appareil de synthèse automatique de peptides du type Beckman, modèle 990, programmé pour réaliser le cycle suivant de lavages: a) chlorure de méthylène; b) acide trifluoroacétique à 33% dans du chlorure de méthylène (2 fois pendant 2,5 et 25 mn); c) chlorure de méthylène; d) éthanol; e) chloroforme; f) triéthylamine à 10% dans du chloroforme (2 fois pendant 25 mn chaque fois); g) chloroforme; h) chlorure de méthylène.

On agite ensuite la résine lavée avec de la t-butyloxy-carbonylglycine (525 mg, 3,0 mmoles) dans du chlorure de méthylène et on ajoute du dicyclohexylcarbodiimide (3,0 mmoles). On agite le mélange à la température ambiante (22-25°C) pendant 2 h et on lave ensuite l'ensemble aminoacide/résine successivement avec du chlorure de méthylène (3 fois), de l'éthanol (3 fois) et du chlorure de méthylène (3 fois). L'acidoacide attaché est débarrassé de sa protection avec de l'acide trifluoroacétique à 33% dans du chlorure de méthylène (2 fois pendant 2,5 et 25 mn), puis on assure le cycle de lavage des phases c) à h) décrites ci-dessus.

Les aminoacides suivants (3 mmoles) sont alors combinés successivement par le même cycle d'opérations: t-Boc-L-proline; t-Boc-L-arginine(Tos); t-Boc-L-leucine; t-Boc-D-tryptophane; t-Boc-tyrosine (2-Br-Cbz); t-Boc-L-sérine(Bzl); t-Boc-L-tryptophane; t-Boc-L-histidine(Tos); L-(pyro)acide glutamique.

L'ensemble décapeptide/résine terminé est lavé avec du chlorure de méthylène (3 fois), puis avec du méthanol (3 fois), et ensuite on dessèche sous pression réduite, pour obtenir ainsi 98% du gain théorique de poids.

La résine de benzhydrylamine utilisée dans cet exemple est une résine disponible sur le marché (réticulation à 1%, Bachem Inc., Marina del Rey, Californie).

Exemple 2

L-Pyroglutamyl-L-histidyl-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-tryptophyl-L-leucyl-L-arginyl-L-prolylglycinamide; I, X = Ser, Y = D-Trp et Z = Gly-NH₂[(pyro)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Trp-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂]

L'enlèvement des groupes protecteurs et la séparation du décapeptide à partir de l'ensemble décapeptide/résine décrit dans l'exemple 1 sont réalisés par traitement avec 1 g de la matière avec de l'acide fluorhydrique (24 ml) et de l'anisole (6 ml) à 0°C pendant 30 mn. On sépare l'acide fluorhydrique sous pression réduite et on enlève l'anisole par lavage avec de l'acétate d'éthyle.

On purifie le peptide brut par filtration sur gel sur une colonne (2,5 x 100 cm) de Sephadex G-25 (dextrane réticulé, chimiquement modifié, de qualité fine) par élution avec de l'acide acétique 2M, et les fractions qui présentent un pic d'absorption principal dans l'ultraviolet à 280 nm sont rassemblées et évaporées jusqu'à sécheresse.

On applique l'huile résiduaire à une colonne (2,5 x 100 cm) de Sephadex G-25 (qualité fine), préalablement équilibrée avec la phase inférieure, puis par la phase supérieure d'un système solvant n-butanol/acide acétique/eau (4/1/5). L'élution avec la phase supérieure donne une fraction de pic maximal, et la matière provenant de cette zone est soumise à une élution sur une colonne (1,4 x 94 cm) de carboxyméthylcellulose suivant les conditions décrites par D.H. Coy et consorts, «*J. Med. Chem.*», 16, 1140 (1973). Les fractions appropriées (1050-1190 ml), après lyophilisation jusqu'à poids constant, donnent de la D-Trp⁶-LH-RH sous la forme d'une poudre duveteuse blanche (80 mg); [α]_D²⁵ = -58,8° (c=0,33, HOAc 1N).

Le produit est homogène lors d'une chromatographie en couche mince dans quatre systèmes solvants distincts, lors de l'application de charges de 20-30 µg, et les taches sont rendues visibles par exposition à une vapeur d'iode, puis au réactif d'Ehrlich. Les valeurs R_f suivantes ont été obtenues: 1-butanol/acide acétique/eau (4/1/5, phase supérieure): 0,25; acétate d'éthyle/pyridine/acide acétique/eau (5/5/1/3): 0,63; 2-propanol/acide acétique 1M (2/1): 0,38; 1-butanol/acide acétique/eau/acétate d'éthyle (1/1/1/1): 0,51.

L'analyse des aminoacides donne: Glu, 1,08; His, 0,95; Trp, 2,00; Ser, 0,94; Tyr, 0,97; Leu, 0,93; Arg, 0,98; Pro, 1,00; Gly, 1,02; NH₃, 1,03.

Exemple 3

L-Pyroglutamyl-L-histidyl(tosyl)-L-tryptophyl-L-séryl(benzyl)-L-tyrosyl(2-bromobenzyloxycarbonyl)-D-phényl-alanyl-L-leucyl-L-arginyl(tosyl)-L-prolylglycyl-résine de benzhydrylamine (R^8 -(pyro)Glu-His-(N^{tm} - R^7)-Trp-Ser(R^6)-Tyr(R^5)-D-Phe-Leu-Arg(N^G - R^4)-Pro-Gly-A; R^4 = Tos, R^5 = 2-Br-Cbz, R^6 = Bzl, R^7 = Tps, R^8 = H et A = résine de benzhydrylamine)

On place une résine de benzhydrylamine (1,25 g, 1 mmole) dans le récipient de réaction d'un appareil de synthèse automatique de peptides du type Beckman, modèle 990, programmé pour réaliser le cycle suivant de lavages: a) chlorure de méthylène; b) acide trifluoroacétique à 33% dans du chlorure de méthylène (2 fois pendant 2,5 et 25 mn); c) chlorure de méthylène; d) éthanol; e) chloroforme; f) triéthylamine à 10% dans du chloroforme (2 fois pendant 25 mn chaque fois); g) chloroforme; h) chlorure de méthylène.

On agite alors la résine lavée avec de la t-butyloxy-carbonylglycine (525 mg, 3 mmoles) dans du chlorure de méthylène et on ajoute du dicyclohexylcarbodiimide (3 mmoles). On agite le mélange à la température ambiante (22-25°C) pendant 2 h et on lave ensuite l'ensemble aminoacide/résine successivement avec du chlorure de méthylène (3 fois) de l'éthanol (3 fois) et du chlorure de méthylène (3 fois). L'acidoacide attaché est débarrassé de sa protection avec de l'acide trifluoroacétique à

33% dans du chlorure de méthylène (2 fois pendant 2,5 et 25 mn), puis on assure le cycle de lavages suivant les phases c) à h) précédentes.

Les aminoacides suivants (3 mmoles) sont alors combinés successivement par le même cycle d'opérations: t-Boc-L-proline; t-Boc-L-arginine(Tos); t-Boc-L-leucine; t-Boc-D-phénylalanine; t-Boc-L-tyrosine (2-Br-Cbz); t-Boc-L-sérine(Bzl); t-Boc-L-tryptophane; t-Boc-L-histidine(Tos); L-(pyro)acide glutamique.

L'ensemble décapeptide/résine terminé est lavé avec du chlorure de méthylène (3 fois), puis avec du méthanol (3 fois), et ensuite on dessèche sous pression réduite, pour obtenir de la sorte 100% du gain de poids théorique.

La résine de benzhydrylamine utilisée dans cet exemple est une résine disponible sur le marché (réticulation à 1%, Bachem Inc., Marina del Rey, Californie).

Exemple 4

L-Pyroglutamyl-L-histidyl-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-phénylalaninyl-L-leucyl-L-arginyl-L-propylglycinamide; I, X = Ser, Y = D-Pheet Z = Gly-NH₂[(pyro)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Phe-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂]

L'enlèvement des groupes protecteurs et la séparation du décapeptide à partir de l'ensemble décapeptide/résine décrit dans l'exemple 3 sont réalisés par traitement de 1,5 g de la matière avec de l'acide fluorhydrique (24 ml) et de l'anisole (6 ml) à 0°C pendant 30 mn. On sépare l'acide fluorhydrique sous pression réduite et on enlève l'anisole par lavage avec de l'acétate d'éthyle. On purifie le peptide brut par filtration sur gel sur une colonne (2,5 × 100 cm) de Sephadex G-25 (dextrane réticulé, chimiquement modifié, de qualité fine) par élution avec de l'acide acétique 2M, et les fractions qui présentent un pic d'absorption principal dans l'ultraviolet à 280 nm sont assemblées et évaporées jusqu'à siccité.

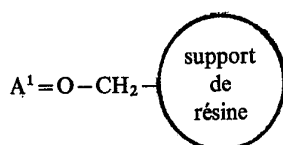
On applique l'huile résiduaire à une colonne (2,5 × 100 cm) de Sephadex G-25 (qualité fine), préalablement équilibrée avec la phase inférieure, puis par la phase supérieure d'un système solvant n-butanol/acide acétique/eau (4/1/5). L'élution avec la phase supérieure donne une fraction de pic maximal, et les fractions de ce pic sont assemblées et concentrées jusqu'à siccité. On lyophilise le reste à partir d'acide acétique 0,2N pour obtenir de la [D-Phe⁶]-LH-RH sous la forme d'une poudre blanche duveteuse (158 mg); $[\alpha]_D^{25} = -57,5^\circ$ (c=0,55, HOAc 0,1N).

Le produit est homogène lors d'une chromatographie en couche mince dans quatre systèmes solvants distincts, lors de l'application de charges de 20-30 µg, et les taches peuvent être rendues visibles par exposition à une vapeur d'iode, puis au réactif d'Ehrlich. Les valeurs R_f suivantes ont été obtenues: 1-butanol/acide acétique/eau (4/1/5, phase supérieure): 0,14; acétate d'éthyle/pyridine/acide acétique/eau (5/5/1/3): 0,68; 2-propanol/acide acétique 1M (2/1): 0,41; 1-butanol/acide acétique/eau/acétate d'éthyle (1/1/1/1): 0,47.

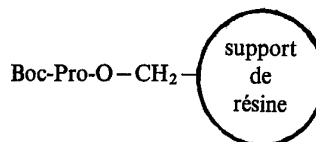
L'analyse des aminoacides donne: Glu, 1,01; His, 0,97; Trp, 0,90; Ser, 0,92; Tyr, 1,00; Phe, 0,96; Leu, 1,00; Arg, 1,02; Pro, 0,95; Gly, 1,00; NH₃, 1,00.

Exemple 5

L-Pyroglutamyl-L-histidyl(dinitrophényl)-L-tryptophyl-D-séryl(benzyl)-L-tyrosyl(2-bromobenzyloxycarbonyl)-D-leucyl-L-leucyl-L-arginyl(tosyl)-L-prolyl-O-CH₂-résine, R⁸-(pyro)Glu-His(N^m-R⁷)-Trp-D-Ser(R⁶)-Tyr(R⁵)-D-Leu-Leu-Arg(N^G-R⁴)-Pro-A¹; R⁴=Tos, R⁵=2-Br-Cbz, R⁶=Bzl, R⁷=Dnp, R⁸=H et



On place de la Boc-proline-résine de la formule:



(1,40 g, 0,5 mmole de proline) dans le récipient de réaction d'un appareil de synthèse automatique de peptides du type Beckman, modèle 990, programmé pour réaliser le cycle suivant de lavages: a) chlorure de méthylène; b) acide trifluoroacétique à 33% dans du chlorure de méthylène (2 fois pendant 2,5 et 25 mn); c) chlorure de méthylène; d) éthanol; e) chloroforme; f) triéthylamine à 10% dans du chloroforme (2 fois pendant 5 mn chaque fois); g) chloroforme, et h) chlorure de méthylène.

On agite alors la résine lavée avec de la t-butyloxycarbonyl-tosylarginine (645 mg, 1,5 mmole) dans du chlorure de méthylène, et on ajoute du dicyclohexylcarbodiimide (1,5 mmole). On agite le mélange à la température ambiante (22-25°C) pendant 2 h, et on lave ensuite l'ensemble aminoacide/résine successivement avec du chlorure de méthylène (3 fois), de l'éthanol (3 fois) et du chlorure de méthylène (3 fois). L'acide attaché est débarrassé de sa protection avec de l'acide trifluoroacétique à 33% dans du chlorure de méthylène (2 fois pendant 2,5 et 25 mn), puis on assure le cycle de lavages suivant les phases c) à h) précédentes.

Les aminoacides suivants (1,5 mmole) sont ensuite combinés successivement par le même cycle d'opérations: t-Boc-L-leucine; t-Boc-D-leucine; t-Boc-L-tyrosine (2-Br-Cbz); t-Boc-D-sérine(Bzl); t-Boc-L-tryptophane; t-Boc-L-histidine(Dnp); L-(pyro)acide glutamique.

L'ensemble nonapeptide/résine terminé est lavé avec du chlorure de méthylène (3 fois), puis avec du méthanol (3 fois), et ensuite on sèche sous pression réduite, de sorte que l'on obtient 96% du gain de poids théorique.

L'ensemble proline/résine utilisé dans cet exemple est préparé au départ d'une résine chlorométhylée disponible sur le marché (réticulation à 1%, Bio Rad Labs, Richmond, Californie).

Exemple 6

L-Pyroglutamyl-L-histidyl-L-tryptophyl-D-séryl(benzyl)-L-tyrosyl(2-bromobenzyloxycarbonyl)-D-leucyl-L-leucyl-L-arginyl(tosyl)-L-propyléthylamide, R⁸-(pyro)Glu-His-Trp-D-Ser(R⁶)-Tyr(R⁵)-D-Leu-Leu-Arg(N^G-R⁴)-Pro-NHR¹; R⁴=Tos, R⁵=2-Br-Cbz, R⁶=Bzl, R⁸=H et R¹=C₂H₅

L'ensemble nonapeptide/résine protégé (2,16 g, décrit dans l'exemple 5) est mis en suspension dans 20 ml d'éthylamine à 0°C, puis on agite pendant 6 h. On laisse ensuite s'évaporer l'excès d'éthylamine à la température ambiante, et le peptide séparé est lavé pour le débarrasser de la résine, avec du diméthylformamide. Le peptide protégé est alors précipité par l'addition d'acétate d'éthyle et filtré pour donner une poudre de couleur crème (672 mg). La valeur R_f sur gel de silice dans un système solvant 1-butanol/acide acétique/eau (4/1/5, phase supérieure) est de 0,45. On utilise alors cette matière dans l'exemple 7 sans autre purification.

Exemple 7

L-Pyroglutamyl-L-histidyl-L-tryptophyl-D-séryl-L-tyrosyl-D-leucyl-L-leucyl-L-arginyl-L-propyléthylamide; I, X = Ser, Y = D-Leu et Z = NHEt[(pyro)Gly-His-Trp-D-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-Pro-NHEt]

L'enlèvement des groupes protecteurs à partir du nonapeptide protégé, préparé comme décrit dans l'exemple 6, est réalisé par traitement de 670 mg de la matière avec de l'acide fluorhydrique (50 ml) et de l'anisole (15 ml) à 0°C pendant 30 mn. On sépare l'acide fluorhydrique sous pression réduite et l'anisole est enlevé par lavage avec de l'éther.

On purifie le peptide brut par filtration sur gel sur une colonne (2,5 × 100 cm) de Sephadex G-25 (dextrane réticulé, chimiquement modifié, de qualité fine) par élution avec de l'acide acétique

0,2M et les fractions présentant un pic d'absorption important dans l'ultraviolet à 280 nm sont assemblées et évaporées jusqu'à siccité.

On applique l'huile résiduaire à une colonne (2,5 × 100 cm) de Sephadex G-25 (qualité fine), préalablement équilibrée avec la phase inférieure, puis par la phase supérieure d'un système solvant n-butanol/acide acétique/eau (4/1/5). L'élution avec la phase supérieure donne une fraction importante ayant une absorption élevée dans l'ultraviolet à 280 nm, et on soumet cette matière à chromatographie sur une colonne (1,5 × 94 cm) de gel de silice, en prévoyant l'élution avec un mélange 1-butanol/acide acétique/eau (4/1/1). Les fractions appropriées (300-390 ml), après évaporation et lyophilisation jusqu'à poids constant à partir d'eau, donnent le [D-Ser⁴, D-Leu⁶, desGly-NH₂¹⁰]-LH-RH éthylamide, sous la forme d'une

poudre blanche duveteuse (103 mg); $[\alpha]_D^{23} = -29,6^\circ$ (c=0,54, HOAc 0,1N).

Le produit est homogène lors d'une chromatographie en couche mince dans quatre systèmes solvants distincts sur des plaques de gel de silice, lors de l'application de charges de 20-30 µg, et les taches sont rendues visibles par exposition à de la vapeur d'iode, puis au réactif d'Ehrlich. Les valeurs R_f suivantes ont été obtenues: 1-butanol/acide acétique/eau (4/1/5, phase supérieure): 0,20; acétate d'éthyle/pyridine/acide acétique/eau (5/5/1/3): 0,72; 2-propanol/acide acétique 1M (2/1): 0,43; 1-butanol/acide acétique/eau/acétate d'éthyle (1/1/1/1): 0,50.

L'analyse des aminoacides donne: Glu, 1,03; His, 0,93, Trp, 1,01; Ser, 0,82; Tyr, 0,97; Leu, 1,98; Arg, 1,00; Pro, 0,90; éthylamine, 0,98.