CH 629 475 A5

(19) SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

(51) Int. Cl.³: C 07 C 103/52

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

ETH-BIBLIOTHEK ZÜRICH

(12) PATENTSCHRIFT A5

(11) 629 475

(21) Gesuchsnummer: 4472/81

(62) Teilgesuch von: 5786/77

(22) Anmeldungsdatum: 09.05.1977

(30) Priorität(en): 11.05.1976 GB 19327/76

(24) Patent erteilt: 30.04.1982

(45) Patentschrift veröffentlicht: 30.04.1982

(73) Inhaber:
Imperial Chemical Industries Limited, London SW1 (GB)

(72) Erfinder:
Anand Swaroop Dutta, Macclesfield/Ches (GB)
Barrington John Albert Furr, Macclesfield/Ches (GB)
Michael Brian Giles, Macclesfield/Ches (GB)

(74) Vertreter:
A. Braun, Braun, Héritier, Eschmann AG, Patentanwälte, Basel

(54) Verfahren zur Herstellung von Polypeptiden.

(57) Polypeptide der Formel:

$$\square\text{Glu-His-Trp-Ser-Tyr-A-B-Arg-Pro-E-F} \qquad \text{I}$$

und ihre pharmazeutisch und veterinär zulässigen Salze werden hergestellt durch Entfernung mindestens einer Hydroxylschutzgruppe aus entsprechenden geschützten Polypeptiden durch Hydrolyse bzw. Hydrogenolyse. Die Hydroxylschutzgruppen sind Benzyl- und/oder tert.-Butyläthergruppen. Es können auch Aminoschutzgruppen vorhanden sein. Diese sind Benzyloxycarbonyl und/oder tert.-Butoxycarbonylgruppen und werden gleichzeitig ebenfalls entfernt. Wenn das Produkt in unprotonierter Form vorliegt, kann man es mit einer Säure, die ein pharmazeutisch und veterinär zulässiges Anion liefert, zu einem Salz umsetzen. In Formel I haben A, B, E und F die im Patentanspruch 1 angegebenen Bedeutungen.

Die Polypeptide der Formel I setzen das Luteinisierungshormon aus der Hypophyse frei und übertreffen dabei das Luliberin (LH-RF). Sie können zur Behandlung der Unfruchtbarkeit beim Menschen und bei der Züchtung von grossen Haustieren verwendet werden.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Herstellung von Polypeptiden der Formel:

$$\text{pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-A-B-Arg-Pro-E-F} \quad \text{I}$$

worin A für D-Tyr, D-Tyr(Me), D-Ser, D-Ser(Bu^t), D-Phe, D-Ala oder D-Trp steht, B für Leu oder MeLeu steht, E für Azgly steht und F für ein Aminoradikal steht oder A für Azgly oder Azala steht, B für Leu steht, E für eine direkte Bindung steht und F für ein Äthylaminoradikal steht; sowie der pharmazeutisch zulässigen Säureadditionssalze derselben, dadurch gekennzeichnet, dass man aus einem entsprechenden Polypeptid, dessen Hydroxylgruppen durch Benzyl- und/oder tert.-Butylgruppen geschützt sind und dessen Aminogruppen gegebenenfalls durch Benzyloxycarbonyl- und/oder tert.-Butoxycarbonylgruppen geschützt sind, mindestens eine Hydroxylschutzgruppe durch Hydrolyse bzw. Hydrogenolyse entfernt, wobei anwesende Aminoschutzgruppen gleichzeitig ebenfalls entfernt werden, worauf man das erhaltene Produkt, wenn es in unprotonierter Form vorliegt, mit einer Säure, die ein pharmazeutisch zulässiges Anion liefert, umsetzt, falls man ein Salz herzustellen wünscht.

2. Verfahren nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man Polypeptide der Formel I herstellt, in welcher A für D-Ser(Bu^t) steht, B für Leu steht, E für Azgly steht und F für ein Aminoradikal steht, wobei das Ausgangsmaterial auch eine oder mehrere der im Anspruch 1 definierten Schutzgruppen trägt.

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung von Polypeptiden, die Luliberinagonisteigenschaften besitzen. Luliberin ist der international übliche Trivialname für LH-RF (luteinising hormone releasing factor) (J. Biol. Chem., 1975, 250, 3215).

Es ist bekannt (Dutta, Furr, Giles und Morley, Clinical Endocrinology, 1976, 5, Ergänzung, S. 291s–298s), dass der Einbau von α-Azaaminosäuren an der 6- oder 10-Stellung von Luliberin Verbindungen ergibt, die hinsichtlich der Freisetzung von Luteinisierungshormon (LH) aus der Hypophyse weniger kräftig sind als das Ausgangsmolekül. Es wurde nunmehr gefunden, dass der Einbau von Azaglycin an der 10-Stellung in Verbindung mit dem Einbau verschiedener D-α-Aminosäuren an der 6-Stellung in Luliberin oder der Einbau von Azaglycin oder Azalanin an der 6-Stellung in Verbindung mit dem Ersatz des endständigen Glycinamids durch ein Äthylaminoradikal in Luliberin Verbindungen ergibt, die hinsichtlich der Freisetzung von Luteinisierungshormon aktiver sind als Luliberin.

Gemäss der Erfindung werden also Polypeptide der Formel

$$\text{pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-A-B-Arg-Pro-E-F} \quad \text{I}$$

worin A für D-Tyr, D-Tyr(Me), D-Ser, D-Ser(Bu^t), D-Phe, D-Ala oder D-Trp steht, B für Leu oder MeLeu steht, E für Azgly steht und F für ein Aminoradikal steht oder A für Azgly oder Azala steht, B für Leu steht, E für eine direkte Bindung steht und F für ein Äthylaminoradikal steht, sowie die pharmazeutisch zulässigen Säureadditionssalze davon hergestellt.

In der obigen Formel I und in der gesamten Beschreibung werden die Aminosäurereste durch ihre Standardabkürzungen (Pure and Applied Chemistry, 1974, 40, 317–331) bezeichnet. Ein α-Aza-aminosäurerest ist ein solcher, in welchem das α-CH einer Aminosäure durch Stickstoff ersetzt worden ist. Die Abkürzung für eine α-Aza-aminosäure leitet sich von der entsprechenden Aminosäure durch Hinzufügung der Vorsilbe «Az» ab. Somit steht Azgly für Azaglycin und Azala für Azalanin.

Wenn die Konfiguration der betreffenden Aminosäure nicht angegeben ist, dann besitzt diese Aminosäure (ausser der α-Aza-aminosäuren, die in der Nachbarschaft der Carboxygruppe kein asymmetrisches Zentrum enthalten) die natürliche L-Konfiguration.

Spezielle Gruppen von erfindungsgemäss herstellbaren Verbindungen sind die folgenden:

Verbindungen, worin A für D-Tyr, D-Tyr(Me), D-Ser, D-Ser(Bu^t), D-Phe, D-Ala oder D-Trp steht, B für Leu oder MeLeu steht, E für Azgly steht und F für ein Aminoradikal steht.

Verbindungen, worin A für Azgly oder Azala steht, B für Leu steht, E für eine direkte Bindung steht und F für ein Äthylaminoradikal steht.

Verbindungen, worin A für D-Tyr(Me), D-Ser, D-Ser(Bu^t), D-Phe, D-Ala oder D-Trp steht, B für Leu oder MeLeu steht, E für Azgly steht und F für ein Aminoradikal steht.

Eine bevorzugte Gruppe von erfindungsgemäss herstellbaren Verbindungen umfasst diejenigen, worin A für D-Tyr(Me), D-Ser(Bu^t) oder D-Phe steht, B für Leu oder MeLeu steht, E für Azgly steht und F für ein Aminoradikal steht.

Die drei bevorzugten erfindungsgemäss erhältlichen Verbindungen besitzen die folgenden Strukturen:

pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Phe-Leu-Arg-Pro-Azgly-NH_2

pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Tyr-(Me)-Leu-Arg-Pro-Azgly-NH_2

pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(Bu^t)-Leu-Arg-Pro-Azgly-NH_2

Spezielle pharmazeutisch oder veterinär zulässige erfindungsgemäss herstellbare Säureadditionssalze sind beispielsweise Hydrochloride, Phosphate, Citrate oder Acetate.

Das erfindungsgemässe Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, dass man aus einem entsprechenden Polypeptid, dessen Hydroxylgruppen durch Benzyl- und/oder tert.-Butylgruppen geschützt sind und dessen Aminogruppen gegebenenfalls durch Benzyloxycarbonyl- und/oder tert.-Butoxycarbonylgruppen geschützt sind, mindestens eine Hydroxylschutzgruppe durch Hydrolyse bzw. Hydrogenolyse entfernt, wobei anwesende Aminoschutzgruppen gleichzeitig ebenfalls entfernt werden, worauf man das erhaltene Produkt, wenn es in unprotonierter Form vorliegt, mit einer Säure, die ein pharmazeutisch zulässiges Anion liefert, umsetzt, falls man ein Salz herzustellen wünscht.

Beim erfindungsgemässen Verfahren können so viele Schutzgruppen im Ausgangsmaterial vorliegen, als Radikale vorhanden sind, die geschützt werden müssen, beispielsweise einige oder alle Radikale, die im Produkt als freie Radikale der Formel OH oder als basische Radikale der Formel NH vorliegen.

Es sei hier ganz allgemein auf Standardhandbücher der Peptidchemie verwiesen, insbesondere M. Bodansky und M.A. Ondetti, «Peptide Synthesis», Interscience, New York, 1966, Kapitel IV; F.M. Finn und K. Hofmann, «The Proteins», Band II, herausgegeben von H. Neurath und R.L. Hill, Academic Press Inc., New York, 1976, Seite 106; «Amino-acids, Peptides and Proteins» (periodische Spezialistenberichte), The Chemical Society, London, Bände 1–8.

Eine erfindungsgemäss brauchbare Schutzgruppe für NH ist das Benzyloxycarbonylradikal und eine brauchbare

Schutzgruppe für OH das Benzylradikal. Beide diese Gruppen können leicht durch Hydrogenolyse entfernt werden, beispielsweise in Gegenwart eines Palladium-auf-Holzkohle-Katalysators.

Eine weitere erfindungsgemäss geeignete Schutzgruppe für NH ist das t-Butoxycarbonylradikal und eine weitere geeignete Schutzgruppe für OH das t-Butylradikal. Beide diese Gruppen können leicht durch Behandlung mit einer Säure, wie z.B. Salzsäure oder Trifluoroessigsäure, entfernt werden.

Eine weitere erfindungsgemäss geeignete Schutzgruppe für NH ist das Benzyloxycarbonyl- oder t-Butoxycarbonylradikal, und eine weitere günstige Schutzgruppe für OH ist das t-Butylradikal. Diese Schutzgruppen können leicht durch Behandlung mit HBr in Essigsäure entfernt werden.

Die Ausgangsmaterialien für die Verwendung beim erfindungsgemässen Verfahren können aus bekannten Verbindungen durch Standardpeptidkupplungsreaktionen, Standardpeptidschutzreaktionen und Standardpeptidschutzgruppenabspaltungsreaktionen hergestellt werden, wie sie Fachleuten auf diesem Gebiet allgemein bekannt sind und wie sie beispielsweise in den Beispielen 1 und 2 angegeben sind.

Wie bereits oben festgestellt, haben die erfindungsgemäss erhältlichen Verbindungen Luliberinagonisteigenschaften, d.h. dass sie ähnliche Wirkungen wie Luliberin aufweisen, ein vom Hypothalamus sekretiertes natürliches Hormon, das auf die Hypophyse wirkt und diese zur Freisetzung von Luteinisierungshormon (LH) und Follikelstimulierungshormon (FSH) veranlasst. Diese beiden Hypophysenhormone spielen bei reproduktiven Prozessen eine Rolle, wobei letzteres, nämlich FSH, in den Ovarien eine Förderung der Reifung der Follikeln bewirkt und ersteres, nämlich LH, die Ovulation induziert. Die Verbindungen der Formel I sind in unerwarteter Weise hinsichtlich des Vermögens der Freisetzung von LH wesentlich kräftiger als Luliberin und eignen sich deshalb für die Beeinflussung und/oder Verbesserung der Vermehrung bei Tieren. Es eignet sich insbesondere für die Züchtung von grossen Haustieren während eines Anöstrusses und bei jeder künstlich beeinflussten Züchtung zur genauen Bestimmung der Ovulation. Es eignet sich auch für die Heilung von Unfruchtbarkeitszuständen bei Mann und Frau.

Der Luliberinagonisteffekt der Verbindungen der Formel I kann beispielsweise durch das Vermögen demonstriert werden, eine Ovulation bei mit Androgen sterilisierten Ratten mit konstantem Östrus zu induzieren oder LH und FSH (gemessen durch doppelte Antikörperradioimmunoassay) in das Blutplasma von unreifen männlichen Ratten oder in das Blutplasma von anöstrischen oder diöstrischen Mutterschafen abzugeben.

Der obige Test an mit Androgen sterilisierten Ratten wird wie folgt ausgeführt:

Mit Androgen sterilisierte weibliche Ratten, die durch Behandlung am 3., 4. und 5. Tag ihres Alters mit 100 µg Testosteronpropionat präpariert worden sind, zeigen einen beständigen östrischen Vaginalschleim und zahlreiche präovulatorische Follikeln in den Ovarien. Die Verabreichung von Luliberin und aktiven Analogen verursacht die Abgabe eines ovulierenden Anstiegs an LH und FSH, der durch die Anwesenheit von Eiern in den Fallopischen Tuben und frischen Corpora lutea in den Ovarien bestimmt werden kann.

Alle in dieser Beschreibung genannten beispielhaften Verbindungen sind hinsichtlich ihres Vermögens, eine Ovulation bei Ratten mit konstantem Östrus zu induzieren, aktiver als Luliberin und zeigen ausserdem keine giftigen Wirkungen, wenn sie in mindestens der 4fachen Dosis ihrer minimal aktiven Dosis verabreicht werden. Insbesondere sind die bevorzugten Verbindungen, die in den Beispielen 6, 8 und 9 beschrieben sind, annähernd 100mal so aktiv als Luliberin. Sie zeigen ausserdem keinerlei toxische Effekte, wenn sie in der 100fachen Menge ihrer minimalen effektiven Dosis verabreicht werden.

Die erfindungsgemäss erhältlichen Verbindungen können in Form von pharmazeutischen oder veterinären Zusammensetzungen, die als aktiven Bestandteil eine Verbindung der Formel I gemeinsam mit einem pharmazeutisch oder veterinär zulässigen Verdünnungsmittel oder Trägermittel enthalten, verwendet werden.

Die Zusammensetzungen können die verschiedensten Formen aufweisen, beispielsweise eine für orale oder buccale Verabreichung geeignete Form, wie z.B. Tabletten, Kapseln, Lösungen oder Suspensionen, eine für nasale Verabreichung geeignete Form, wie z.B. Schnupfmittel, Nasenspray oder Nasentropfen; eine für vaginale oder rektale Verabreichung geeignete Form, wie z.B. Suppositorien; oder für eine parenterale Verabreichung geeignete Form, wie z.B. sterile injizierbare Lösungen oder Suspensionen.

Im allgemeinen werden die obigen Zusammensetzungen in üblicher Weise unter Verwendung herkömmlicher Exzipienzien hergestellt. Zusammensetzungen für orale Verabreichung können jedoch eine Beschichtung aufweisen, um den aktiven Polypeptidbestandteil von den Wirkungen von Enzymen im Magen zu schützen.

Die Zusammensetzungen können ausserdem zusätzlich zu einem Polypeptid der Formel I ein oder mehrere bekannte Wirkstoffe enthalten, die aus Prostaglandinderivaten ausgewählt sind, wie z.B. Prostaglandin-$F_2\alpha$, Cloprostinol oder Fluprostinol, oder einen anderen Wirkstoff, wie z.B. Clomiphen oder Tamoxifen.

Bevorzugte Zusammensetzungen sind solche, die sich für orale Verabreichung in Einheitsdosierungsform eignen, wie z.B. eine Tablette, eine Kapsel, ein Trank oder ein Bolus, wobei dieselben 2,5 bis 500 mg und vorzugsweise 10 bis 100 mg eines Polypeptids in jeder Einheitsdosierungsform aufweisen, oder solche, die sich für parenterale Verabreichung eignen, welche 5 µg bis 1 mg eines Polypeptids je ml und vorzugsweise 10 µg bis 100 µg eines Polypeptids je ml Lösung enthalten.

Eine parenterale Zusammensetzung ist vorzugsweise eine Lösung in isotonischer Kochsalzlösung oder isotonischer Dextrose, nötigenfalls auf einen pH von 5 bis 9 gepuffert. Alternativ kann die parenterale Zusammensetzung so aufgebaut sein, dass sie den Wirkstoff langsam abgibt, in welchem Falle die Menge des Polypeptids je Einheitsdosierungsform im allgemeinen grösser ist, als sie erforderlich ist, wenn eine herkömmliche injizierbare Form verwendet wird. Eine bevorzugte parenterale Formulierung mit langsamer Wirkstoffabgabe enthält 100 µg bis 1 mg Polypeptid je Einheitsdosierung.

Die Zusammensetzungen werden im allgemeinen so verabreicht, dass die tägliche Dosis 50 µg bis 20 mg/kg beträgt. Eine tägliche parenterale Dosis, beispielsweise durch intravenöse, subkutane oder intramuskuläre Injektion oder Infusion beträgt 0,2 µg/kg bis 100 µg/kg. Bei Menschen entsprechen diese Dosen einer gesamten täglichen Dosis von 3,5 mg bis 1,4 g bei oraler Verabreichung und einer gesamten täglichen Dosis von 14 µg bis 7 mg bei parenteraler Verabreichung. Wenn die Verabreichung über die Schleimmembranen erfolgt, dann liegt die Dosis zwischen den oben angegebenen Bereichen für orale und parenterale Verabfolgung.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele näher erläutert.

In den Beispielen bezieht sich R_f auf die aufsteigende Dünnschichtchromatografie (t.l.c.) auf Silicagelplatten (Kieselgel G). Die in dieser Chromatografie verwendeten Lösungsmittelsysteme waren Butan-1-ol/Essigsäure/Wasser (4:1:5 V/V) (R_fA), Butan-1-ol/Essigsäure/Wasser/Pyridin

(15:3:12:10 V/V) (R_fB), Butan-2-ol/3% G/V wässriges Ammoniumhydroxyd (3:1 V/V) (R_fC), Acetonitril/Wasser (3:1 V/V) (R_fD), Aceton/Chloroform (1:1 V/V) (R_fE), Chloroform/Äthanol (1:4 V/V) (R_fF), Cyclohexan/Äthylacetat (1:1 V/V) R_fG), Cyclohexan/Äthylacetat/Methanol (1:1:1 V/V) (R_fH), Chloroform/Methanol/Wasser (11:8:2 V/V) (R_fK), Chloroform/Methanol (19:1 VV) (R_fP) und Chloroform/Methanol (9:1 V/V) (R_fQ). In allen diesen Fällen wurden die Platten unter UV-Licht geprüft und mit Fluorescamin, Ninhydrin und Chlor-Stärke-Jodid-Reagentien behandelt. Wenn nichts anderes angegeben ist, dann bedeuten die angegebenen R_f-Werte, dass ein einziger Fleck durch diese Verfahren bestimmt wurde.

Säurehydrolysate aller in dieser Beschreibung beschriebenen Produkte wurden dadurch hergestellt, dass das Peptid oder geschützte Peptid mit 6n Salzsäure, die 1% (G/V) Phenol enthielt in einem verschlossenen evakuierten Rohr 16 st auf 100 °C erhitzt wurde. Die Aminosäurezusammensetzung eines jeden Hydrolysats wurde mit einem LoCarte-Aminosäure-Analysator bestimmt. Die Zusammensetzung entsprach in jedem Fall der Erwartung. Der Ausdruck «in üblicher Weise aufgearbeitet», der in den Beispielen verwendet wird, besagt, dass nach der Umsetzung jeder feste Rückstand durch Filtration entfernt wurde, das Filtrat unter 40 °C zur Trockne eingedampft wurde, der Rückstand in Äthylacetat mit einer 20%igen Zitronensäurelösung, Wasser, gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet wurde und das Äthylacetat im Vakuum eingedampft wurde, wobei die Verbindung zurückblieb.

Beispiele 1 und 2

Synthese von L-Pyroglutamyl-L-histidyl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-A-B-L-arginyl-L-prolyl-azaglycin-amid.

Allgemeines Verfahren (o) (Schemata 4 und 6).

Eine Lösung von 50 mg des geschützten Decapeptidderivats, das Ser(Bu^t) in der 6-Stellung oder Tyr(Bu^t) in der 5-Stellung aufwies, in 5 ml 90%iger (V/V) wässriger Trifluoroessigsäure wurde hergestellt. Drei Tropfen β-Mercaptoäthanol wurden zugegeben und die Lösung wurde 45 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, und der Rückstand wurde einmal aus Wasser und zweimal aus t-Butanol gefriergetrocknet. Die Ausbeute war 90 bis 100%.

Die erfindungsgemäss hergestellten Verbindungen sind als Beispiele 1 und 2 in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle

pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-A-B-Arg-Pro-E-F

Beispiel Nr.	A	B	E	F	Verfahren	Ausbeute %	Papierelektrophorese R_F (relativ zu Luliberin) pH 2,1	pH 6,5	R_{fA}
1	D-Ser	Leu	Azgly	NH_2	o	95	0,94	0,96	0,25
2	D-Phe	MeLeu	Azgly	NH_2	o	46	0,84	0,87	0,35

Die Ausgangsmaterialien für die Verwendung in dem obigen Verfahren können so erhalten werden, wie es in den folgenden Schemata 4 und 6 [Verfahren (o)] beschrieben ist.

Bei diesen Schemata wurden die folgenden Konzentrationen verwendet:

OCp = 2,4,5-Trichlorphenylester
Bzl = Benzyl
Z = Benzyloxycarbonyl
Boc = t-Butoxycarbonyl
DMF = Dimethylformamid

Die eingekreisten Zahlen beziehen sich auf die betreffende Stufe.

Stufe ④.

Das N-t-Butoxycarbonylderivat wurde in Äthylacetat aufgelöst und mit 3n HCl in Äthylacetatlösung (4 Äquivalente) während 1 st bei Raumtemperatur behandelt.

Stufe ㊽

Wie Stufe ④

Stufe ㊾

5,4 mMol L-Pyroglutamyl-L-histidyl-L-tryptophyl-L-serin-methylester wurden in 70 ml Dimethylformamid aufgelöst und mit 100 mMol Hydrazinhydrat 4 st behandelt. Dimethylformamid wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde mit Äthanol trituriert, gesammelt, mit Äthanol und Äther gewaschen und getrocknet (88,2%), Fp. 184 bis 189 °C, R_fA 0,18, R_fB 0,55, R_fC 0,39, R_fD 0,27, R_fK 0,58.

Stufe ㊽ [A = D-Tyr(Me)]

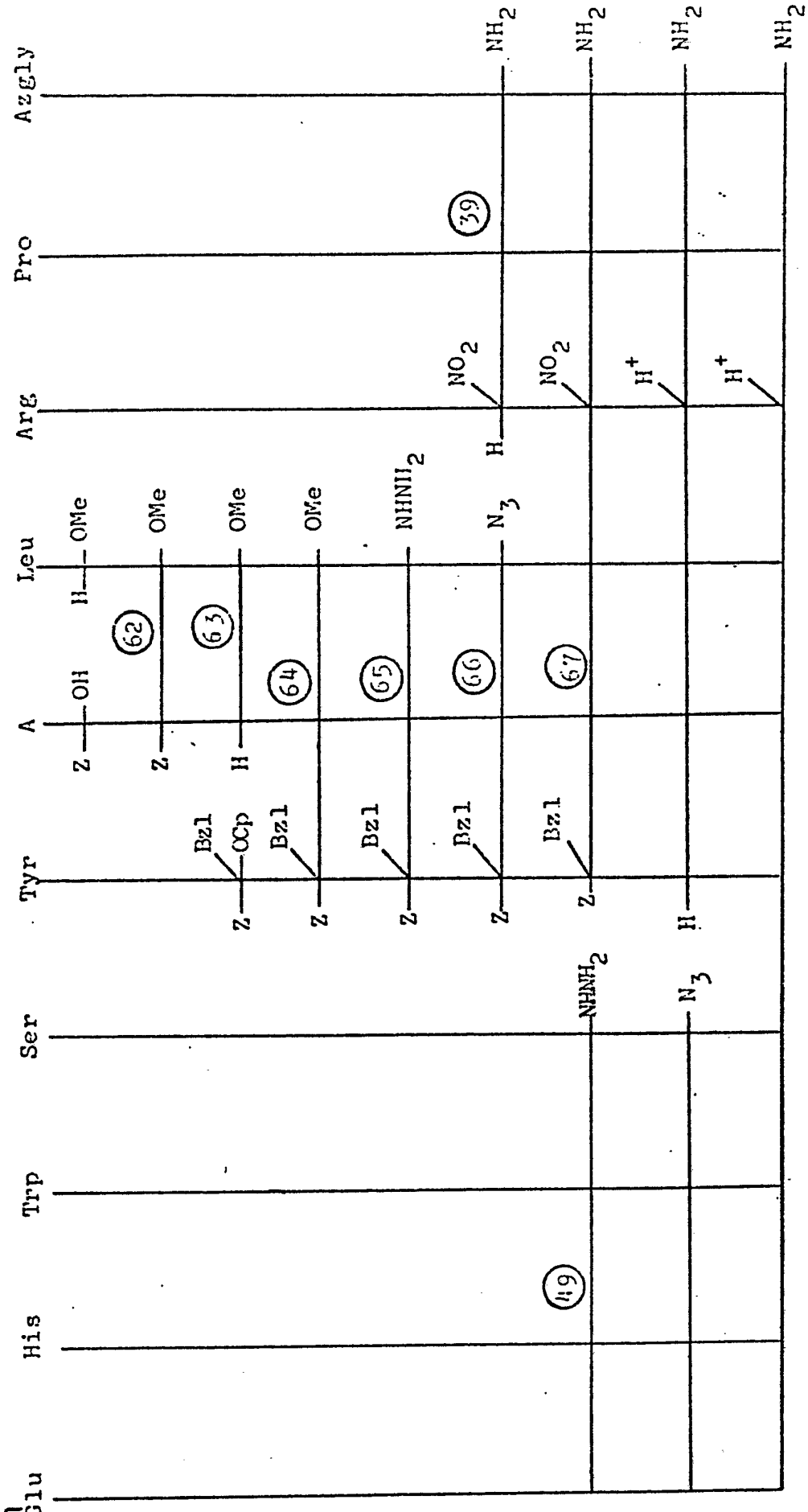
Eine Lösung von 3,17 g (9,64 mMol) Z-D-Tyr(Me)-OH, 1,92 g (10,6 mMol) Leu-OMe · HCl, 2,6 g (19,2 mMol) 1-Hydroxybenzotriazol und 1,6 ml (11 mMol) Triäthylamin in 30 ml Dimethylformamid wurde auf 0 °C abgekühlt und 2,29 g (11,1 mMol) N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid wurden zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei 4 °C gerührt und in der üblichen Weise aufgearbeitet. Umkristallisation aus heissem Cyclohexan ergab das geschützte Dipeptidderivat. Ausbeute 1,41 g (95,2%), R_fD 0,83, R_fE 0,69, R_fP 0,72, R_fQ 0,76.

Stufe ㊾ [A = D-Tyr(Me)]

12,9 mMol Hydrazinhydrat wurden zu einer Lösung von 4,59 g (6,4 mMol) Z-Tyr(Bzl)-D-Tyr(Me)-Leu-OMe in 25 ml Dimethylformamid und 50 ml Methanol zugegeben und das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Methanol wurde im Vakuum entfernt und das Produkt wurde mit Wasser ausgefällt, gesammelt, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Fp 212 bis 213 °C, R_fE 0,49, R_fF 0,66, R_fH 0,69, R_fQ 0,70.

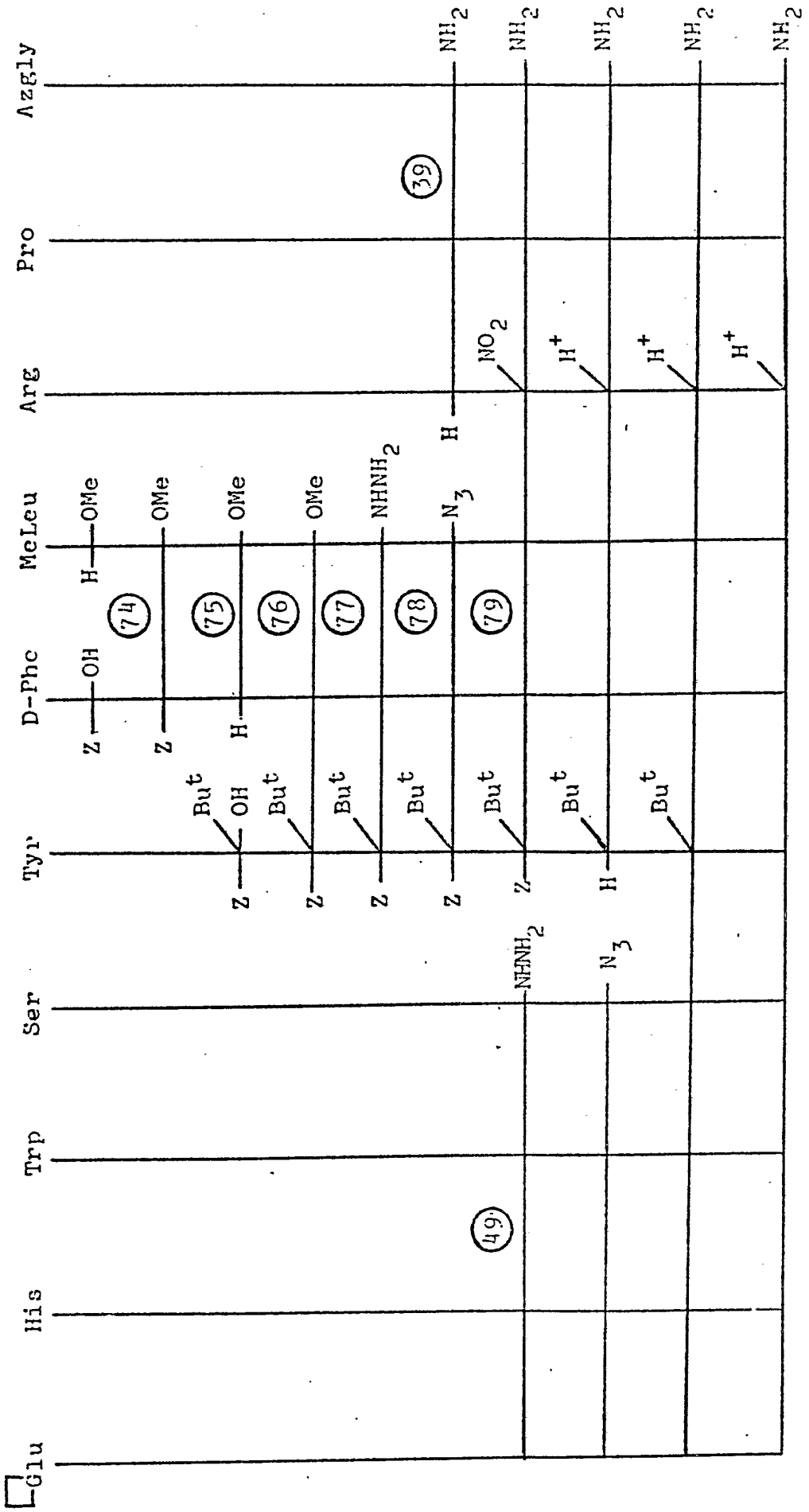
Stufen ㊿ und ⑤① [A = D-Tyr(Me)]

3,54 g (5,0 mMol) des Hydrazids aus Stufe ㊾ wurden in 10 ml DMF aufgelöst und die gerührte Lösung wurde auf –20 °C abgekühlt. 3,38 ml (20 mMol) 5,92m HCl in Dioxan wurden zugegeben, worauf sich der Zusatz von 0,6 ml (5,25 mMol) t-Butylnitrit anschloss. Nach 2 min wurde eine vorgekühlte Lösung von 2,04 g (5 mMol) H-Arg(NO_2)-Pro-Azgly-NH_2 · HCl und 3,55 ml (25 mMol) Triäthylamin in 10 ml DMF zugegeben und das Rühren wurde über Nacht bei 4 °C fortgesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde in der üblichen



A = D-Ser(Bu^t)

Schema 4


Glu
His
Trp
Ser
Tyr
D-Phe
MeLeu
Arg
Pro
Azgly
Z
OH
H
OMe
But
NHNH2
N3
NO2
H+
NH2
49
74
75
76
77
78
79
39

Schema 6

Weise aufgearbeitet und das rohe Produkt wurde durch Silicagelkolonnenchromatografie unter Verwendung von Chloroform, 5%igem (V/V) Methanol in Chloroform und 10%igem (V/V) Methanol in Chloroform als Eluierlösungsmittel gereinigt. Ausbeute 3,72 g (70,9%), R_fA 0,64, R_fB 0,72, R_fC 0,55, R_fD 0,66, R_fF 0,40, R_fH 0,52.

Stufe ⑫ [A = D-Ser(Bu^t)]

Wie Stufe ⑧. Das Produkt wurde aus wässrigem Methanol kristallisiert. Ausbeute 90,4%, Fp. 107 bis 108 °C, R_fD 0,80, R_fE 0,68, R_fF 0,73, R_fH 0,72, R_fP 0,72, R_fQ 0,74.

Stufe ⑬ [A = D-Ser(Bu^t)]

Katalytische Reduktion über 5%igem (G/G) Palladium-auf-Holzkohle-Katalysator in DMF/Wasser (8:2) während 5 st.

Stufe ⑭ [A = D-Ser(Bu^t)]

Eine Lösung von 19,17 g (32,7 mMol) Z-Tyr-(Bzl)-OCp und 32,7 mMol H-Ser-(Bu^t)-Leu-OMe in 100 ml Dimethylformamid wurde 72 st bei Raumtemperatur stehengelassen. Übliche Aufarbeitung ergab einen Feststoff, der gesammelt, mit Äther gewaschen und getrocknet wurde. Ausbeute 17,6 g (79,4%), Fp. 135 bis 137 °C, R_fD 0,80, R_fH 0,77, R_fQ 0,81.

Stufe ⑮ [A = D-Ser(Bu^t)]

Wie Stufe ⑨. Umkristallisation aus wässrigem Methanol. Ausbeute 56,2%, Fp. 134 bis 136 °C, R_fD 0,66, R_fH 0,64, R_fQ 0,64.

Stufen ⑯ und ⑰ [A = D-Ser(Bu^t)]

Wie Stufen ⑩ und ⑪. Das Produkt wurde durch Silicagelkolonnenchromatografie unter Verwendung von Chloroform und 5%igem (V/V) Methanol in Chloroform als Eluierlösungsmittel gereinigt. Ausbeute 38,5%, Fp. 142 bis 145 °C, R_fA 0,64, R_fB 0,71, R_fC 0,55, R_fD 0,65, R_fF 0,46, R_fH 0,43, R_fQ 0,16.

Stufe ⑭

1,8 ml (18 mMol) Äthylchloroformiat wurden zu einer auf −15 °C abgekühlten und gerührten Lösung von 5,99 g (20 mMol) Z-Phe-OH und 2,2 ml (20 mMol) N-Methylmorpholin in 60 ml DMF zugegeben. Nach 2 min wurde eine auf −15 °C vorgekühlte Lösung von 4,8 g (20 mMol) H-MeLeu-OMe · HBr und 2,8 ml (20 mMol) Triäthylamin in 20 ml DMF zugegeben und das Reaktionsgemisch wurde 30 min bei 0 °C und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde in der üblichen Weise aufgearbeitet. Ausbeute 7,54 (90%), Öl.

Stufe ⑮

Katalytische Reduktion über 5%igem (G/G) Palladium-auf-Holzkohle-Katalysator in Methanol mit einem Gehalt an 1 Äquivalent Chlorwasserstoff während 3 st.

Stufe ⑯

Hergestellt durch Kuppeln von 16,02 g (43,2 mMol) Z-Tyr-(Bu^t)-OH und 13,15 g (40,0 mMol) H-D-Phe-MeLeu-OMe · HCl wie in Stufe ⑭. Das Produkt wurde durch Silicagelkolonnenchromatografie unter Verwendung von Chloroform und 5%igem (V/V) Methanol in Chloroform als Lösungsmittel gereinigt. Ausbeute 60%, Öl, R_fG 0,48, R_fP 0,71, R_fQ 0,73.

Stufe ⑰

Eine Lösung von 6,52 g (9,76 mMol) Z-Tyr-(Bu^t)-D-Phe-MeLeu-OMe und 97,6 mMol Hydrazinhydrat in 50 ml Methanol wurde über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen. Methanol wurde im Vakuum entfernt und das Hydrazid wurde aus Methanol/Äther kristallisiert mit Methanol/Wasser (1:1 V/V) und Äther gewaschen und getrocknet. Ausbeute 5,2 g (80%), Fp. 135 °C, R_fD 0,75, R_fE 0,69, R_fF 0,66, R_fH 0,79, R_fQ 0,73.

Stufen ⑱ und ⑲

Wie Stufen ⑩ und ⑪. Währenddes Aufarbeitungsverfahrens fiel das Produkt aus Äthylacetat aus. Es wurde abfiltriert, mit Äthylacetat und Äther gewaschen und getrocknet. Ausbeute 58,5%, Fp. 145 bis 148 °C, R_fD 0,72, R_fF 0,40, R_f H 0,53, R_fQ 0,18.

Beispiele 3 bis 10

Unter Anwendung der in den Beispielen 1 und 2 beschriebenen allgemeinen Verfahren können die folgenden Verbindungen hergestellt werden:

pGlu-His-Trp-Ser-A-B-Arg-Pro-E-F

Beispiel Nr.	A	B	E	F	Papierelektrophorese R_f pH 2,1	(bezogen auf Luliberin) pH 6,5	R_{fA}
3	Azgly	Leu	–	NHC_2H_5	0,98	1,03	0,28
4	Azala	Leu	–	NHC_2H_5	0,97	1,0	0,30
5	D-Ala	Leu	Azgly	NH_2	0,97	1,0	0,30
6	D-Phe	Leu	Azgly	NH_2	1,0	0,71	0,27
7	D-Trp	Leu	Azgly	NH_2	0,53	0,37	0,37
8	D-Tyr(Me)	Leu	Azgly	nH_2	0,92	0,87	0,25
9	D-Ser(Bu^t)	Leu	Azgly	NH_2	0,94	0,96	0,25
10	D-Tyr(Me)	MeLeu	Azgly	NH_2	0,87	0,90	0,34