



NORGE

[NO]

**STYRET
FOR DET INDUSTRIELLE
RETTSVERN**

[B] (11) UTLEGNINGSSKRIFT Nr. 145691

(51) Int. cl.³ C 07 C 103/52

(21) Patentsøknad nr. 750763

(22) Inngitt 07.03.75

(24) Løpedag 07.03.75

(61) Tillegg til patent nr. 143218
(søknad nr. 743538)

(41) Alment tilgjengelig fra 09.09.75

(44) Søknaden utlagt, utlegningskrift utgitt 01.02.82

(30) Prioritet begjært 08.03.74, Japan, nr. 27442/74

(54) Oppfinnelsens benevnelse Analogifremgangsmåte til fremstilling av terapeutisk virksomme decapeptidamider.

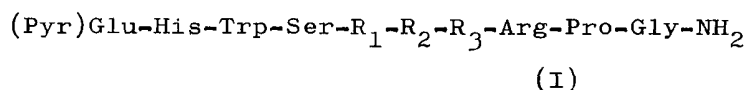
(71)(73) Søker/Patenthaver TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.,
27 Doshomachi 2-chome,
Higashi-ku, Osaka,
Japan.

(72) Oppfinner MASAHIKO FUJINO, Takarazuka, Hyogo,
TSUNEHICO FUKUDA, Suita, Osaka,
SUSUMA SHINAGAWA, Higashi-Osaka, Osaka,
Japan.

(74) Fullmektig Bryns Patentkontor A/S, Oslo.

(56) Anførte publikasjoner Ingen.

Foreliggende oppfinnelse angår fremstilling av nye decapeptidamidderivater med sterk eggløsningsinduserende aktivitet, og som kan angis ved hjelp av følgende formel:



hvor R_1 er Tyr eller Phe; R_2 er D-Nle, D-Nva, D-Abu, D-Phe, D-Ser, D-Thr eller D-Met og R_3 er Leu, Ile eller Nle.

I det nedenstående er aminosyrer og peptider samt deres aktiverte karboksyl- eller beskyttende grupper angitt ved forkortelser som vanligvis brukes når det gjelder slike peptider og som er godkjent av Committee on Biochemical Nomenclature of IUPAC-IUB. Aminosyrene har L-konfigurasjonen hvis intet annet er angitt.

De følgende forkortelser er f.eks. brukt.

Abu: α -aminoømsørsyre

Arg: arginin

BOC: t-butoksykarbonyl

Bzl: benzyl

DCC: N,N'-disykloheksylkarbodiimid

Gly: glycin

His: histidin

HONB: N-hydroksey-5-norbornene-2,3-dikarboksimid

Leu: leucin

Nle: norleucin

Nva: norvalin
Met: metionin
OMe: metylester
OBzl: benzylester
ONB: N-hydroksy-5-norbornene-2,3-dikarboksimidester
OSu: N-hydroksysuccinimidester
Phe: fenylalanin
Pro: prolin
(Pyr)Glu: pyroglutaminsyre
Ser: serin
Thr: treonin
Tos: tosyl
Trp: tryptofan
Tyr: tyrosin.

Det har vært kjent i mange år at hypotalamus inneholder faktorer som på et høyt nivå regulerer sekresjonen av tropiske hormoner fra hypofysen. Etter isolasjonen av et tyrotropinfrigjørende hormon (TRH), har et luteiniserende hormonfrigjørende hormon (LH-RH) blitt ekstrahert i ren form fra svin og sauer og vist seg å være et decapeptid med strukturen: (Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂. (A.V. Schally et al, Biochem. Biophys. Res. Commun., 43, 1334(1971); R. Guillemin et al, Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A. 69, 278(1972)). Denne oppdagelse har blitt fulgt av en syntese av en rekke tilsvarende og liknende peptider, og man har også utført geologiske prøver med disse analoge peptider. Det har imidlertid vist seg at selv en meget liten modifikasjon i ovennevnte aminosyresammensetning i vesentlig grad svekker den fysiologiske aktivitet, og man har antatt at ovennevnte kjemiske struktur er nødvendig for at man skal få maksimal fysiologisk aktivitet. (A.V. Schally et al, Biochem. Biophys. Res. Commun., 4, 366 (1972)).

Nylig har Monahan et al i "Biochemistry", vol. 12, nr. 23, sidene 4616-4620 (1973) vist at blant LH-RH-analoger så som (Ala⁶)LH-RH, (D-Ala⁶)LH-RH, (Val⁶)LH-RH, (D-Val⁶)LH-RH, (Pro⁶)LH-RH og (D-Pro⁶)LH-RH som alle ble syntetisert av nevnte forskere, så hadde (D-Ala⁶)LH-RH den sterkeste aktiviteten, og den var fra 350-450% i forhold til den opprinnelige LH-RH. Det er videre i litteraturen angitt at LH-RH-analoger som har en D-aminosyre i 6-stillingen og hvor hovedmengden av sidekjedene er forskjellig fra

D-Ala, er mindre virksomme enn det opprinnelige hormon. Til tross for det som er nevnt ovenfor, har man nå syntetisert polypeptider (I) som har D-aminosyre i 6-stilling og hvor størstedelen av sidekjedene er forskjellig fra D-Ala, og man har undersøkt deres LH-RH-aktivitet og uventet funnet at de foreliggende polypeptider (I) minst er 1000% mer virksomme enn det opprinnelige LH-RH. Foreliggende oppfinnelse er basert på disse oppdagelser.

Hensikten med foreliggende oppfinnelse er å tilveiebringe nye decapeptidamidderivater med formel I som har sterk egglosningsinduserende aktivitet.

Ifølge foreliggende oppfinnelse fremstilles således forbindelsene med formel I ved at man kondenserer en reagens (A) som er L-pyroglytaminsyre eller en forbindelse som helt eller delvis omfatter ovennevnte aminosyrefrekvens hvortil dennes terminale N-atom er bundet en L-pyroglutaminsyrerest (dvs. (Pyr)Glu-), med en reagens (B) som er et amin tilsvarende resten av ovennevnte decapeptidamidderivat, og hvor reagensene (A) og (B) eventuelt er beskyttet, hvoretter man til slutt fjerner de eventuelt tilstedeværende beskyttende grupper.

Grunnleggende kombinasjoner av reagens (A) og reagens (B) er angitt i følgende tabell 1.

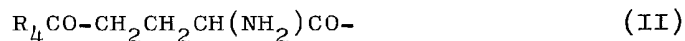
145691

4

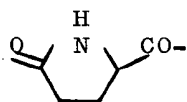
Tabell 1

Reagens		
Kombina- sjon	(A)	(B)
1	(Pyr)Glu-OH	H-His-Trp-Ser-R ₁ -R ₂ - R ₃ -Arg-Pro-Gly-NH ₂
2	(Pyr)Glu-His-OH	H-Trp-Ser-R ₁ -R ₂ -R ₃ - Arg-Pro-Gly-NH ₂
3	(Pyr)Glu-His-Trp-OH	H-Ser-R ₁ -R ₂ -R ₃ -Arg- Pro-Gly-NH ₂
4	(Pyr)Glu-His-Trp-Ser-OH	H-R ₁ -R ₂ -R ₃ -Arg-Pro- Gly-NH ₂
5	(Pyr)Glu-His-Trp-Ser-R ₁ -OH	H-R ₂ -R ₃ -Arg-Pro- Gly-NH ₂
6	(Pyr)Glu-His-Trp-Ser-R ₁ -R ₂ -OH	H-R ₃ -Arg-Pro-Gly- NH ₂
7	(Pyr)Glu-His-Trp-Ser-R ₁ -R ₂ - R ₃ -OH	H-Arg-Pro-Gly-NH ₂
8	(Pyr)Glu-His-Trp-Ser-R ₁ -R ₂ -R ₃ - Arg-OH	H-Pro-Gly-NH ₂
9	(Pyr)Glu-His-Trp-Ser-R ₁ -R ₂ -R ₃ - Arg-Pro-OH	H-Gly-NH ₂
10	(Pyr)Glu-His-Trp-Ser-R ₁ -R ₂ -R ₃ - Arg-Pro-Gly-OH	NH ₃

Det er også kjent at en beskyttet L-glutamylgruppe med formel (II):



(hvor R_4 er en alkoksygruppe (f.eks. metoksy, etoksy, n-propoksy, i-propoksy, n-butoksy etc.) en aralkyloksygruppe (f.eks. benzyloksy etc.) eller amino), lett kan omdannes til selve L-pyroglutamylgruppen:



ved kontakt med en base (f.eks. ammoniakk etc.) eller en syre (f.eks. eddiksyre), og at gruppen med formel (II) i så henseende tilsvarer selve L-pyroglutamylgruppen. I foreliggende fremgangsmåte er det underforstått at L-pyroglutamyl (f.eks. (Pyr)Glu-) i reagens (A) ikke bare innbefatter L-pyroglutamylgruppen i seg selv, men også den beskyttede L-glutamylgruppe med formel (II). I de tilfeller hvor (Pyr)Glu- i reagens (A) er representert ved gruppen med formel (II), så kan denne gruppe lett omdannes til selve L-pyroglutamylgruppen ved hjelp av fremgangsmåter som i seg selv er kjente.

Kondensasjonsreaksjonen ifølge foreliggende oppfinnelse kan utføres ved hjelp av kondenserende midler som er kjent for dannelse av peptidbindinger. Blant slike fremgangsmåter er DCC/HONB-prosessen (belgisk patent nr. 796.399), azidprosessen, kloridprosessen, syreanhydridprosessen, blandede syreanhydridprosessen, DCC-prosessen, aktiv esterprosessen, Woodward reagens K-prosess, karbo-diimidazolprosess, oksydasjon-reduksjonsprosessen og andre (The Peptides, Vol.1(1966), Schröder og Lubke, Academic Press, New York, U.S.A.).

Før kondensasjonsreaksjonen kan man eventuelt beskytte karboksylgruppen og aminogrupper som ikke bør inngå i den angitte reaksjon, eller aktivere karboksylgruppen eller/og aminogrupper som skal ta del i reaksjonen, f.eks. ved hjelp av fremgangsmåter som i seg selv er kjente. Karboksylgrupper i utgangsmaterialet kan f.eks. beskyttes i form av metallsalter (f.eks. natrium- og kaliumsalter) eller estere (f.eks. metyl, etyl, benzyl, p-nitrobenzyl, t-butyl eller t-amylestere).

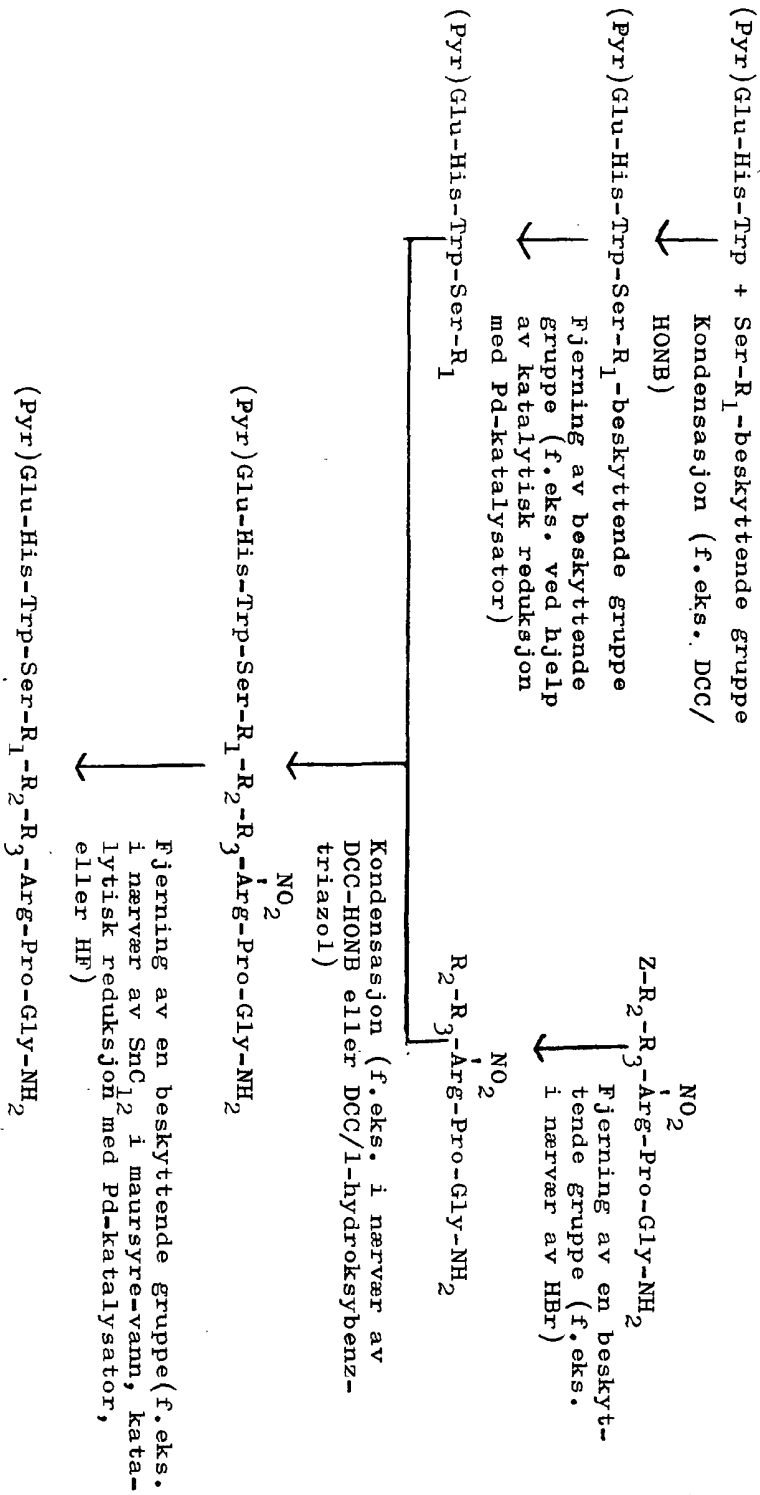
Beskyttende grupper for aminogrupper i utgangsmaterialene kan være en hver av hensiktsmessig beskyttende grupper som brukes for aminogrupper i peptidsynteser, f.eks. benzyloksykarbonyl, t-butoksykarbonyl, isobornyloksykarbonyl etc. Iminogruppen i histidin kan beskyttes ved hjelp av kjente beskyttende grupper, f.eks. benzyl, tosyl, 2,4-dinitrofenol, t-butoksykarbonyl eller karbo-benzoksy. Hydroksylgruppen i serin kan beskyttes ved hjelp av vanlige kjente beskyttende grupper, f.eks. benzyl, t-butyl eller andre eter-dannende grupper. Hydroksylgruppen i tyrosin kan beskyttes med benzyl, t-butyl og andre eter-dannende grupper; guanidinogruppen i arginin kan beskyttes ved slike grupper som nitro, tosyl, karbo-benzoksy, isobornyloksykarbonyl eller adamantyloksykarbonyl. Som eksempel på aktiverte karboksylgrupper i utgangsmaterialene kan man nevne det tilsvarende syreanhydrid, azid, aktive estere (f.eks. estere med alkoholer (f.eks. pentaklorfenol, 2,4,5-triklorfenol, 2,4-dinitrofenol, cyanometylalkohol, p-nitrofenol, N-hydroksy-5-norbornen-2,3-dikarboksyimid, N-hydroksysuccinimid, N-hydroksy-ftalimid eller N-hydroksybenzotriazol), etc. De aktiverte aminogrupper i utgangsmaterialene kan f.eks. være det tilsvarende fosforsyreamid.

Den følgende tabell viser noen kombinasjoner av slike former av karboksyl og aminogrupper i reagensene (A) og (B).

Tabell 2.

Eksempelvis kombinasjoner	Utgangsmateriale			
	(A)		(B)	
	COOH	NH ₂	COOH	NH ₂
1*	fri	beskyttet	beskyttet	fri
2	aktivert	beskyttet	fri	fri
3	fri	beskyttet	beskyttet	aktivert

(Bemerkning) De tilfeller som er angitt ved hjelp av en *, er det foretrukket at et dehydreringsmiddel (f.eks. en karbodiimidreagens såsom disykloheksyl-karbodiimid) er tilstede i reaksjonssystemet. En fremgangsmåte for gjennomføring av foreliggende oppfinnelse i praksis kan angis på følgende måte.



Denne reaksjon kan utføres i nærvær av et oppløsningsmiddel. Oppløsningsmidlet kan velges fra de som er kjent for anvendelse under peptidkondensasjonsreaksjoner. Man kan f.eks. bruke vannfritt eller vandig dimetylformamid, dimetylsulfoksyd, pyridin, kloroform, dioksan, diklormetan, tetrahydrofuran og egnede blandinger av slike oppløsningsmidler.

Reaksjonstemperaturen kan velges i det område som er kjent for reaksjoner som fører til dannelse av peptidbindinger, d.v.s. normalt i området fra -20 til $+30^{\circ}\text{C}$. Videre kan forløperforbindelser (beskyttede peptider) for de her angitte forbindelser lett fremstilles ved såkalt fast-fase-syntetiske prosesser.

Etter at den utførte kondensasjonsreaksjon er ferdig, så kan beskyttende grupper hvis disse er tilstede fjernes på vanlig kjent måte. Blant slike måter kan man anvende katalytisk reduksjon i nærvær av en katalysator såsom palladiumsvart, palladium-på-karbon, platina eller liknende, solvolyse ved hjelp av hydrogenfluorid, trifluoreddiksyre eller liknende, og reduksjon med metallisk natrium i flytende ammoniakk.

Det således fremstilte peptid (I) kan innvinnes fra reaksjonsproduktblandingen ved hjelp av fremgangsmåter som er kjent for innvinning av peptider, f.eks. ved ekstraksjon, fordeling mellom flere faser, kolonnekromatografi etc.

Den foreliggende fremgangsmåte kan utføres ved en vanlig kjent fast-fasemetode.

Peptidet med formel (I) kan også innvinnes i form av et salt eller en metallkompleksforbindelse.

Blant syrer som kan danne salter med peptider kan nevnes uorganiske syrer såsom saltsyre, hydrobromsyre, perklorsyre, salpetersyre, tiocyanisyre, svovelsyre, fosforsyre etc., og organiske syrer såsom maursyre, eddiksyre, propionsyre, glykolsyre, melkesyre, pyrodruesyre, oksalsyre, malonsyre, ravsyre, maleinsyre, fumarisyre, antranylinsyre, kanelisyre, naftalensulfonsyre eller sulfanylinsyre.

Metaller som kan danne metallkomplekser med peptider med formel (I) innbefatter blant andre sink, nikkell, kobolt, kobber og jern. Slike metallkompleksforbindelser kan fremstilles på vanlig kjent fremgangsmåte, f.eks. ved å omsette peptidet med formel (I) med et hydroksyd eller et oksyd av et metall av de ovennevnte typer,

ved en pH fra 6 til 8.

Polyeptider med formel (I) som fremstilt ifølge oppfinnelse har LH-RH (luteiniserende hormonfrigjørende hormon) aktivitet, og er følgelig i stand til å fremme sekresjonen av LH (luteiniserende hormon) og FSH (follikelstimulerende hormon). Polypeptider med formel (I) kan således brukes som medisiner for å fremme egg-løsning hos kvinner og hos andre dyr (f.eks. rotter, sauer, svin, kuer, hester, raphøns eller høner). Peptidene kan også brukes for andre farmasøytiske formål av samme type som man bruker vanlig LH-RH, LH og FSH preparater for.

Ettersom LH-RH aktiviteten for polypeptider med formel (I) er fra 10 til 25 ganger sterkere enn for kjent naturlig forekommende LH-RH, kan deres dose bestemmes for hver anvendelse på basis av deres ovennevnte effekt samtidig som man tar andre faktorer (f.eks. tilførselsmåte og type av lidelse) i betraktning. En egnet dose kan f.eks. velges i området fra 5 ng. (nanogram) til 10 µg daglig pr. kg kroppsvekt.

Polyeptider med formel (I) vil primært bli tilført ikke-oralt (f.eks. ved injeksjon eller ved rektal eller vaginal vei), skjønt man kan også tilføre preparatene oralt i visse tilfeller.

Doseringsformen kan f.eks. innbefatte injeksjoner, suppositorier, pessarier og pulvere. Injeksjonene kan fremstilles ved å oppløse fra 10γ til 500γ av et polypeptid (formel I) i 100 ml fysiologisk saltvæske. Polypeptider med formel (I) kan også fremstilles til lyofiliserte ampulleprodukter med manitol tilsett som et fortynningsmiddel, slik at de kan tilføres som injeksjonsoppløsninger.

De utgangsmaterialer som brukes i foreliggende fremgangsmåte kan enten fremstilles ved hjelp av kjente fremgangsmåter for peptidsynteser eller ved å bruke andre fremgangsmåter når dette er nødvendig.

De etterfølgende eksempler illustrer fremstillingen av de nye forbindelsene.

I eksemplene har man anvendt følgende forkortelser som betyr Rf-verdier på et tynnsljikt-kromatogram som er utført på silisiumdioksydgel med følgende oppløsningsmiddelsystemer:

Rf¹: kloroform - metanol - eddiksyre, 9:1:0,5

Rf²: etylacetat - pyridin - eddiksyre - vann, 30:10:3:5.

Rf³: n-butanol - etylacetat - eddiksyre - vann, 1:1:1:1.

Eksempel 1

Fremstilling av (Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Phe-(D)-Nva-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂.

a) Fremstilling av Z-(D)-Nva-Leu-Arg(NO₂)-Pro-Gly-NH₂.
En oppløsning av 380 mg Z-(D)-Nva-OH, 690 mg H-Leu-Arg(NO₂)-Pro-Gly-NH₂ og 300 mg HONB i 5 ml dimetylformamid ble tilsatt 340 mg DCC ved 0°C under røring. Blandingen ble rørt i 2 timer ved 0°C og deretter 10 timer ved romtemperatur. Reaksjonsblandingen ble filtrert for å fjerne dannet disykloheksyl-urea, og filtratet ble fordampet til tørrhet. Det resulterende residuum ble oppløst i 100 ml kloroform, og oppløsningen ble vasket med en 4% vandig natriumbikarbonatoppløsning og med vann. Den vaskede oppløsning ble tørket over vannfritt magnesiumsulfat og fordampet til tørrhet. Residuemet ble så behandlet med en blanding av etylacetat (25 ml) og eter (25 ml) og dette ga et hvitt pulver som ble oppsamlet ved filtrering og gjenutfelt fra etanol-eter: utbytte 1,12 g (α)_D²³ - 50,5° (c=1,1 i metanol), Rf¹=0,32.

Analyse for C₃₂H₅₂O₉N₁₀

Beregnet C 53,32, H 7,27, N 19,43

Funnet C 53,49, H 7,56, N 19,19.

b) Fremstilling av (Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Phe-(D)-Nva-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂.

1,0 g Z-(D)-Nva-Arg(NO₂)-Pro-Gly-NH₂ ble oppløst i 10ml 25% hydrogenbromid i eddiksyre, og oppløsningen ble rørt i 50 minutter. Reaksjonsblandingen ble fortynnet med 200 ml tørr eter og man fikk et bunnfall og dette ble oppsamlet ved filtrering og vasket med tørr eter. Pulveret ble tørket over natriumhydroksyd under redusert trykk. Dette pulver ble oppløst i 10 ml dimetylformamid sammen med 1,0g (Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Phe-OH og 440 mg HONB. Oppløsningen ble avkjølt til 0°C og så tilsatt 400 mg DCC under røring. Blandingen ble rørt i 6 timer ved 0°C og deretter 16 timer ved romtemperatur. Reaksjonsblandingen ble filtrert for å fjerne dannet dicykloheksyl-urea, og filtratet ble behandlet ved hjelp av 100 ml eter for å få dannet et bunnfall som ble oppsamlet ved filtrering. Bunnfallet ble oppløst i 10% vandig etanol, og oppløsningen ble påsatt en kolonne av polystyrenharpiks ("Amberlite XAD-2", 150-250 mesh, 3,5 x 25 cm), og kolonnen ble eluert ved hjelp av en gradientelueringsmetode med 10% vandig etanol og 100% etanol (500:550 ml).

Hovedfraksjonen (380-520 ml) ble oppsamlet og fordampet til tørrhet. Residuumet ble oppløst i 5 ml varm metanol og gjenutfelt ved hjelp av etylacetat, og man fikk det beskyttede decapeptidamid, 1,41 g (α)_D²⁴ = 35,4° (c=0,12 i metanol), Rf²=0,20, Rf³=0,56.

Det beskyttede decapeptidamid (500 mg) ble oppløst i 5 ml vanfritt hydrogenfluorid sammen med 0,5 ml anisol ved -70°C. Etter røring i 30 minutter ved -5°C ble hydrogenfluoridet fjernet ved fordamping. Det resulterende residuum ble oppløst i 20 ml vann, og oppløsningen ble ekstrahert to ganger med 10 ml etylacetat. Det vandige lag ble påsatt en kolonne av karboksymetylcellulose (2x33 cm), og kolonnen ble eluert ved hjelp av en gradientelueringsmetode hvor man brukte ammoniumacetatbuffer som eluat (0,005mol, pH 6,8(500 ml) ---- 0,2 mol, pH 6,8(500 ml)). Hovedfraksjonen (420 - 680 ml) ble oppsamlet og lyofilisert til et hvitt pulver, utbytte 380 mg. (α)_D²² = 32,4° (c=0,52 i 5% eddiksyre), Rf²=0,05, Rf³=0,68.

Aminosyreanalyse: His 1,01, Arg 0,98, Trp 0,87, Ser 0,94, Glu 1,00, Pro 1,02, Gly 1,00, Nva 1,01, Leu 1,00, Phe 0,97 (peptidinnhold 84%).

Eksempel 2.

Fremstilling av (Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-(D)-Nle-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ ved fast faseprosess.

a) Fremstilling av BOC-Gly-harpiks.

I 60 ml kloroform-etanol (2:1) tilsatte man klormetyl-harpiks (Cl-innhold 2,0 m mol/g) fulgt av 10,5 g BOC-Gly og 8,4 ml trietylamin. Blandingen ble rørt ved romtemperatur i 1,5 time og deretter oppvarmet i 24 timer. Harpiksen ble innvunnet ved filtrering og vasket med dimetylformamid og videre med etanol, vann, etanol og eter i denne rekkefølge og deretter tørket. Utbytte 17,55 g. En aminosyreanalyse viste at harpiksen inneholdt 0,88 millimol/g av BOC-Gly.

b) Fremstilling av (Pyr)Glu-His(Tos)-Trp-Ser(Bzl)-Tyr-(Bzl)-D-Nle-Leu-Arg(Tos)-Pro-Gly-harpiks.

Reaksjonstanken i et automatisk peptidsynteseapparat (Model: APS-800) ble tilsatt 2,177 g BOC-Gly-harpiks som ble fremstilt som nevnt under avsnitt a) ovenfor, og deretter svellet med diklormetan i 12 timer. Deretter ble de følgende aminosyrer tilført i den cyklus som er angitt nedenfor.

145691

12

BOC-Pro, BOC-Arg(Tos), BOC-Leu, BOC-D-Nle, BOC-Tyr (Bzl), BOC-Ser(Bzl), BOC-Trp, BOC-His(Tos), (Pyr)Glu.

Diklormetan (3 minutter x 3) → 50% trifluoreddiksyre/diklormetan (10 minutter og 30 minutter) → diklormetan (3 min x 3) → etanol (3 min. x 3) → diklormetan (3 min. x 3) → 10% trietylamin/kloroform (10 min.) → kloroform (3 min. x 3) → diklormetan (3 min. x 2) → BOC-aminosyre-anhydrid (syntetisert fra BOC-aminosyre og DCC ved hjelp av rutineteknikk) (30 min. og 60min.) → acetylering (med eddiksyreanhydrid i diklormetan og trietylamin) (1 time) → diklormetan (3 min. x 3) (bare (Pyr)Glu blir direkte kondensert med DCC i dimetylformamid).

Til slutt ble harpiksen vasket med etanol, kloroform og dimetylformamid. Den ble så vasket med eter og tørket. Utbytte var 6,20 g.

c) Fremstilling av (Pyr)Glu-His(Tos)-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-D-Leu-Leu-Arg(Tos)-Pro-Gly-NH₂.

I 50 ml ammoniakk-mettet metanol ble det suspendert 2,622 g av den harpiks hvis fremstilling er beskrevet under avsnitt b), og suspensjonen ble rørt ved romtemperatur i 70 timer.

Harpiksen ble innvunnet ved filtrering og vasket med dimetylformamid. Filtratet og vaskeoppløsningen ble slått sammen, konsentrert til tørrhet under redusert trykk og behandlet med eter. Fremgangsmåten gir 1,187 g av et urent pulver.

En 588 mg's porsjon av dette produkt ble rensert på en tørr kolonne av 50 g silisiumdioksydgel idet man brukte som utvikler en oppløsningsmiddelblanding av metanol og kloroform, og man fikk ialt 186 mg av det angitte produkt.

d) Fremstilling av (Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂.

I nærvær av 0,2 ml anisol og 0,2 ml merkaptoetanol ble 173,3 mg av det beskyttede peptid hvis fremstilling er beskrevet under avsnitt c) ovenfor, oppløst i 5 ml tørr hydrogenfluorid, og oppløsningen ble rørt ved 0°C i 1 time. Den ble deretter konsentrert til tørrhet under redusert trykk, og konsentratet ble oppløst i 20 ml vann. Uløselige faste stoffer ble frafiltrert, og filtratet ført ned en kolonne (1,5 cm dia. x 20 cm i lengde) av en sterk basisk anjonisk utbytningsharpiks ("Amberlite IRA-410", acetat-form). Den utstrømmende væske ble rensert ved hjelp av

—
—
karboksyl-metylcellulose (1,5 x 22 cm; gradientelueringsmetode idet man brukte 0,005 mol til 0,2 mol ammoniumacetat ved pH 6,8) og polystyrenharpiks ("Amberlite XAD-2", 1,5 x 7,5 cm; gradientelueringsmetode idet man brukte 5% til 70% vandig etanol). Eluatet ble ytterligere underkastet en gelfiltreringskromatografi på "Sephadex LH-20"; 0,9 x 53,5 cm; 0,1 N eddiksyre). Denne fremgangsmåte gir 39 mg av den forønskede forbindelse. $(\alpha)_{\text{D}}^{24} -40,5^{\circ}$ (c=0,5 i 5% vandig eddiksyre).

Aminosyreanalyse (syrehydrolyse i nærvær av tioglykolinsyre):

Glu 0,97, His 0,97, Trp 0,94, Ser 0,88, Tyr 1,0, Leu 1,00, Nle 1,06, Arg 1,03, Pro 1,00, Gly 1,03 (87% innvinning).

Eksemlene 3-13.

Ved å bruke de fremgangsmåter som er angitt i eksempel 2 bortsett fra at man brukte de utgangsmaterialer som er angitt i den følgende tabell, fikk man fremstilt de decapeptidamider (formel I) som er angitt i tabellen.

Tabell.

Eksem- pel	Decapeptidamid (formel I)	$(\alpha)_D^{24}$ i 5% vandig eddiksyre	R ₁	R ₂	R ₃	Aminosyreanalyse	Utgangsmaterialer anvendt istedenfor de som er angitt i eksempel 2.
3	Tyr D-Ser Leu	-44,8°				His 1,02, Arg 1,01, Trp 0,97, Ser 1,91, Glu 1,00, Pro 1,01, Gly 1,03, Leu 0,97, Tyr 0,96.	BOC-Tyr(Bzl) BOC-D-Nle BOC-Leu BOC-Tyr(Bzl) BOC-D-Ser BOC-Leu (Bzl)
4	Tyr D-Abu Leu	-43,2°				His 0,96, Arg 1,00, Trp 0,89, Ser 0,92, Glu 1,00, Pro 1,00, Gly 0,99, Abu 0,97, Leu 1,00, Tyr 0,98	BOC-Tyr(Bzl) BOC-D-Abu BOC-Leu
5	Tyr D-Nva Leu	-38,9°				His 1,00, Arg 0,99, Trp 0,92, Ser 0,91 Glu 1,00, Pro 1,00, Gly 1,01, Nva 0,97, Leu 0,98, Tyr 0,98	BOC-Tyr(Bzl) BOC-D-Nva BOC-Leu
6	Tyr D-Thr Leu	-37,5°				His 1,01, Arg 0,98, Trp 0,95, Thr 1,00, Ser 0,92, Glu 1,00, Pro 1,00, Gly 0,99, Leu 1,00, Tyr 0,98	BOC-Tyr(Bzl) BOC-D-Thr BOC-Leu

Eksem- pel	Decapeptidamid (formel I)	$(\alpha)^{24}_D$ i 5% vandig eddiksyre	Aminosyreanalyse	Utgangsmaterialer anvendt istedenfor de som er angitt i eksempel 2.
R ₁	R ₂	R ₃		
7	Tyr D-Phe Leu	-52,4°	His 1,00, Arg 0,99, Trp 0,87, Ser 0,89, Glu 1,00, Pro 0,99, Gly 1,01, Leu 0,98, Phe 1,00, Tyr 0,96	BOC-Tyr(Bzl) BOC-D-Nle BOC-Leu
8	Tyr D-Met Leu	-42,0°	His 0,98, Arg 1,00, Trp 0,98, Ser 0,92, Glu 0,99, Pro 0,98, Gly 1,00, Met 0,79, Leu 1,00, Tyr 1,00	BOC-Tyr(Bzl) BOC-D-Met BOC-Leu
9	Phe D-Phe Leu	-69,5°	His 1,00, Arg 0,98, Trp 0,87, Ser 0,98, Glu 1,01, Pro 0,98, Gly 1,00, Leu 1,00, Phe 1,98	BOC-Phe BOC-D-Phe BOC-Leu
10	Tyr B-Abu Ile	-38,5°	His 1,00, Arg 1,00, Trp 0,92, Ser 0,88, Glu 1,03, Pro 1,00, Gly 1,00, Abu 0,96, Ile 0,98, Tyr 0,98	BOC-Tyr(Bzl) BOC-D-Abu BOC-Ile

Eksem- pel	Decapeptidamid (formel I)	$(\alpha)_D^{24}$ (c=0,5 i 5% vandig eddiksyre)	Aminosyreanalyse	Utgangsmaterialer anvendt istedenfor de som er angitt i eksempel 2.
R ₁	R ₂	R ₃		
11	Phe D-Ser Nle	-32,5°	His 0,96, Arg 0,94, Trp 0,87, Ser 1,87, Glu 1,00, Pro 0,99, Gly 1,00, Nle 0,96, Phe 1,02	BOC-Tyr(Bzl) BOC-D-Nle BOC-Leu BOC-Phe BOC-D-Ser BOC-Nle
12	Phe D-Nle Nle	-35,1°	His 1,00, Arg 1,01, Trp 0,81, Ser 0,89, Glu 1,02, Pro 1,00, Gly 1,00, Nle 2,02, Phe 0,97	BOC-D-Nle BOC-Nle BOC-Phe
13	Phe D-Nva Ile	-35,5°	His 0,96, Arg 1,00, Trp 0,86, Ser 0,89, Glu 1,00, Pro 1,00, Gly 0,98, Nva 0,90, Ile 0,92, Phe 0,99	BOC-D-Nva BOC-Ile BOC-Phe

Sammenligningsdata (eggløsningsinduserende aktivitet)

Eggløsningsinduserende aktivitet ble bestemt under anvendelse av Sprague-Dawley hunnrotter med 4-dagers cyklus og holdt i et belyst miljø fra 7.30 til 21.30. LH-RH-standard eller de aktuelle peptider ble administrert subkutant kl. 14.30 på dagen for diestrus, og det dannede egg i ampulla i egglederen ble innspisert under et differensial-interferencmikroskop om morgenen neste dag. ED₅₀-verdiene ble sammenlignet med de til LH-RH-standardpreparatet. Følgende resultater ble oppnådd:

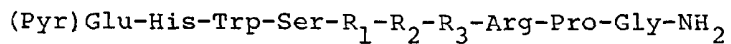
LH-RH-analoger			Aktivitet
R ₁	R ₂	R ₃	<u>Relativ virkningsgrad</u> (LH-RH = 1)
Phe	(D)-Nva	Leu	18
Tyr	(D)-Nle	Leu	22
Tyr	(D)-Ser	Leu	27
Tyr	(D)-Abu	Leu	25
Tyr	(D)-Nva	Leu	25
Tyr	(D)-Thr	Leu	24
Tyr	(D)-Phe	Leu	28
Tyr	(D)-Met	Leu	25
Phe	(D)-Phe	Leu	20
Tyr	(D)-Abu	Ile	12

LH-RH = pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂

ED₅₀ for LH-RH standard preparat = 215 ± 12 ng/ pr. 100 g legemes-
vekt for rotte.

P a t e n t k r a v

Analogifremgangsmåte ifølge norsk patent nr. 143218, for fremstilling av ytterligere terapeutisk virksomme forbindelser med formelen:



hvor R_1 er Tyr eller Phe, R_2 er D-Nle, D-Nva, D-Abu, D-Phe, D-Ser, D-Thr eller D-Met og R_3 er Leu, Ile eller Nle, k a r a k t e r i s e r t v e d at man kondenserer en reagens (A) som er L-pyroglytaminsyre eller en forbindelse som helt eller delvis omfatter ovennevnte aminosyrefrekvens hvortil dennes terminale N-atom er bundet en L-pyroglutaminsyrerest (dvs. (Pyr)Glu-), med en reagens (B) som er et amin tilsvarende resten av ovennevnte decapeptidamidderivat, og hvor reagensene (A) og (B) eventuelt er beskyttet, hvoretter man til slutt fjerner de eventuelt tilstedeværende beskyttende grupper.