

(12)

# PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 1060/84

(51) Int.Cl.<sup>5</sup> : **C07K 7/20**  
//A61K 37/02

(22) Anmeldetag: 29. 3.1984

(42) Beginn der Patentdauer: 15. 6.1989

(45) Ausgabetag: 25. 1.1990

(30) Priorität:

29. 3.1983 HU 1062/83 beansprucht.

(56) Entgegenhaltungen:

DE-OS2438350

(73) Patentinhaber:

RICHTER GEDEON VEGYESZETI GYAR R.T.  
BUDAPEST (HU).

(72) Erfinder:

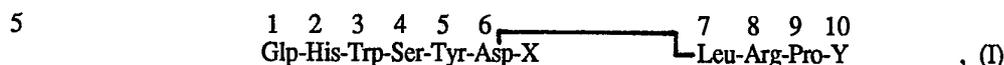
SEPRÖDI JANOS DR.  
BUDAPEST (HU).  
TEPLAN ISTVAN DR.  
BUDAPEST (HU).  
MEZÜ IMRE DR.  
BUDAPEST (HU).  
ERCHEGYI JUDIT DR.  
BUDAPEST (HU).

(54) VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON NEUEN GONADOLIBERIN-DERIVATEN

AT 389 704 B

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von neuen Gonadoliberin-Derivaten, die eine Beta-Asparaginylgruppe enthalten.

Die neuen Verbindungen entsprechen der allgemeinen Formel



worin

10 X für eine Gruppe der allgemeinen Formel -O-R, in der R Benzyl oder C<sub>1</sub>- bis C<sub>4</sub>-Alkyl bedeutet, oder für einen Rest der allgemeinen Formel -NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub> steht, in welchem letzterem R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub> unabhängig voneinander Wasserstoff, C<sub>1</sub>- bis C<sub>5</sub>-Alkyl, C<sub>3</sub>- bis C<sub>6</sub>-Cycloalkyl, Aryl, im Alkylteil 1 oder 2 Kohlenstoffatome enthaltendes Aalkyl darstellen oder gemeinsam mit dem angrenzenden Stickstoffatom eine Morpholino-, 1-Indoliny- oder 1-Pyrrolidinygruppe bilden und

15 Y für eine Glycinamid- oder für eine Alkylamidgruppe mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen steht, sowie von deren Säureadditionssalzen.

20 Die in der Formel verwendeten Symbole entsprechen der in der Peptidchemie üblichen Nomenklatur (s. z. B. J. Biol. Chem. 241, 527 (1966); 247, 977 (1972)). Zusätzlich werden in der Beschreibung noch die folgenden Abkürzungen verwendet: EA = Äthylamino-, DEA = Diäthylamino-, CBA = Cyclobutylamino-, FBA = (1,1-Dimethyl-2-phenyl)-äthylamino-, IND = 1-Indoliny-, PIR = 1-Pyrrolidiny-, ANI = Phenylamino-, BOC = Butyloxycarbonylgruppe.

Das Gonadoliberin (in der Fachliteratur auch als "gonadotrop releasing hormon", GnRH, LH-RH, luteinisierendes und follikelstimulierendes Hormon, LH- und FSH-RH bezeichnet) und seine bekannten Derivate haben die allgemeine Eigenschaft, das luteinisierende Hormon (LH) und das follikelstimulierende Hormon (FSH) freisetzen zu können.

25 Aus der Literatur ist bekannt (m. Monahan u. a., Biochemistry 12, 4616-4620 (1973); J. Sandow u. a., Control of Ovulation, Butterworths, London 1978, pp. 49-70), daß diejenigen Derivate des Gonadoliberins, die statt des 6-ständigen Glycinrests eine Aminosäure mit D-Konfiguration oder deren Derivate aufweisen, sowie diejenigen, in denen der 10-ständige Glycinamidteil durch eine Amidgruppe mit aliphatischer Kette ersetzt ist (M. Fujino u. a., J. Med. Chem. 16, 1144 (1973)), eine stärkere und zeitlich länger anhaltende biologische Wirkung haben als das Gonadoliberin. Demgegenüber ist aber auch bekannt, daß die in 6-Stellung eine L-Aminosäure, zum Beispiel L-Alanin, L-Prolin, L-Valin (Monahan u. a., Biochemistry 12, 4616 (1973)) L-Isoleucin (D. Coy u. a.: J. Med. Chem. 16, 1140 (1973)) oder eine Aminosäure ohne Asymmetriezentrum, zum Beispiel Gamma-Aminobuttersäure, Beta-Alanin (J. Rivier u. a., Peptides: Chemistry, Structure, Biology, Ed. R. Walter, J. Meienhofer, Ann Arbor Science Publishers Inc. Michigan, p. 803 (1975)) oder Sarkosin (W. Arnold u. a., J. Med. Chem. 17, 314 (1974)) enthaltenden Gonadoliberin-Derivate nur über eine minimale Aktivität verfügen.

35 Zum Freisetzen von LH erwies sich nur eine Verbindung mit L-Konfiguration als biologisch wirksamer Substituent in 6-Stellung geeignet, und zwar ein spezieller L-Gamma-Lactamring (Veber u. a., Science 210, 656 (1980)).

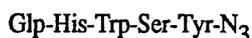
40 Ziel der Erfindung ist die Herstellung neuer Gonadoliberin-Derivate, die eine vorteilhaftere Wirkung haben als die bekannten Analoga.

Die Erfindung beruht auf der Erkenntnis, daß die biologische Wirkung der in 6-Stellung eine D-Aminosäure enthaltenden Gonadoliberin-Derivate erreicht oder übertroffen werden kann von Verbindungen, in denen die L-Asparaginsäure über ihre Beta-Carboxylgruppe in die 6-Stellung der Peptidkette des Gonadoliberins eingebaut ist, während die Alpha-Carboxylgruppe frei bleibt oder durch verhältnismäßig kleine Atomgruppen substituiert ist.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß man ein Tetra- oder Pentapeptid der allgemeinen Formel



worin die Bedeutung von X und Y die gleiche wie oben ist, oder ein Salz davon mit dem Pentapeptidazid der Formel



60 kondensiert, gewünschtenfalls ein erhaltenes Nona- bzw. Decapeptidamid der Formel (I) durch Umsetzen mit einer physiologisch verträglichen Säure in ein Säureadditionssalz überführt oder aus einem erhaltenen Säureadditionssalz durch Umsetzen mit einer Base das Derivat der Formel (I) freisetzt und gewünschtenfalls aus einem erhaltenen Nona- bzw. Decapeptidamid der Formel (I) einen Metallkomplex bildet.

Das als Ausgangsstoff erforderliche Tetra- oder Pentapeptid der Formel (II) kann in an sich bekannter Weise -

nach der Azid-, Anhydrid- oder Carbodiimidmethode, der Methode der aktivierten Ester oder anderen bekannten Aktivierungsmethoden - mittels Fragmentkondensation oder schrittweiser Kettenverlängerung hergestellt werden. Das Tri- oder Tetrapeptid H-Leu-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Y, worin die Bedeutung von Y die gleiche wie oben ist, wird mit einem an der Aminogruppe durch die tert. Butoxycarbonyl- oder die Benzyloxycarbonylgruppe geschützten Asparaginsäurederivat der allgemeinen Formel



worin die Bedeutung von X die gleiche wie oben ist, E für Hydroxyl, Azido, N-Succinimidoxy oder für gegebenenfalls durch Nitro oder durch Halogen substituiertes Phenoxy; vorzugsweise für die p-Nitro-, 2,4,6-Trichlor-, Pentachlor- oder Pentafluorphenoxygruppe, steht und Z tert. Butyloxycarbonyl oder Benzyloxycarbonyl bedeutet - acyliert und von der erhaltenen Verbindung wird die Schutzgruppe entfernt.

Die neuen Gonadoliberin-Derivate der Formel (I) können auch durch schrittweisen Aufbau der Peptidkette hergestellt werden, wobei zunächst die geschützte C-terminale Aminosäure, nämlich BOC-Glycin oder BOC-Prolin, an chlormethyliertes oder Benzhydrylaminogruppen enthaltendes Polystyrol-Divinylbenzol-Harz gekoppelt wird, sodann die Peptidkette aufgebaut wird und das fertige Peptid vom Polymerisat durch Ammonolyse, Aminolyse bzw. durch Behandlung mit Fluorwasserstoff und die Schutzgruppen durch Behandlung mit Fluorwasserstoff abgespalten werden.

Diese Methode zur Peptidsynthese in der festen Phase ist aus der Literatur bekannt (J. M. Steward: "Solid Phase Peptide Synthesis", Freeman and Co., San Francisco, 1969).

Mit der automatisch gesteuerten Synthese in der festen Phase (D. Coy et al., Biochemistry 13, 323 (1974); D. Coy et al., J. Med. Chem. 19, 423 (1976)) wurden schon zahlreiche Gonadoliberin-Analoga hergestellt.

Zum Einbau des Asp-X in 6-Stellung kann ein Aminosäurederivat der allgemeinen Formel



worin die Bedeutung von X die gleiche wie oben ist und R<sub>3</sub> für Wasserstoff, p-Nitrophenyl oder Pentafluorphenyl, steht, verwendet werden. Zum vorübergehenden Schutz der übrigen Aminosäureseitenketten des Moleküls werden Gruppen verwendet, die sich mit Fluorwasserstoff später entfernen lassen, zum Beispiel im Falle von Arginin und Histidin die p-Toluolsulfonylgruppe, im Falle von Serin und Tyrosin die Benzylgruppe.

Arzneimittelpräparate, die als Wirkstoff die neuen Verbindungen der allgemeinen Formel (I) oder deren Säureadditionssalze enthalten, können zweckmäßig hergestellt werden, indem man die Verbindungen, ihre Säureadditionssalze oder Komplexe zusammen mit den in der pharmazeutischen Industrie üblichen Träger- und/oder Streckmitteln zu Tabletten, Dragees, Kapseln, Suppositorien, Injektionslösungen, Nasensprays usw. formuliert.

Ein bevorzugter Vertreter der neuen Verbindungen der allgemeine Formel (I) ist die Verbindung der Formel



die am androgenisierten Versuchsratten mit größerer Wirksamkeit Ovulation hervorruft als natives LH-RH, obwohl ihre LH-freisetzende Wirkung um eine Größenordnung geringer ist als die des nativen LH-RH.

In einem anderen Versuch wurden Stör- und Hechtmutterfische mit einer Dosis von 20 µg der Verbindung (XI)/kg behandelt, woraufhin 80 % der Fische leichten, während bei der Kontrollgruppe, die unter den gleichen Bedingungen mit dem aus der Literatur als superaktiv bekannten D-Phe<sup>6</sup>, des Gly<sup>10</sup>-LH-RH-äthylamid behandelt wurde, keine Ovulation eintrat.

Die Verbindung der Formel (XI), in einer Dosis von 100 µg i. m. gleichzeitig mit der Insemination angewendet, verbesserte die Wahrscheinlichkeit der Trächtigkeit um 25-30 %, während sich natives LH-RH in dieser Dosis als wirkungslos erwies.

In einer einmaligen Dosis von 10 µg verabfolgt, löste die Verbindung (XI) bei Blau- und Silberfischen Paarungen außerhalb der Paarungszeit aus, während natives LH-RH auch in diesem Fall wirkungslos war.

Mit einer anderen der erfindungsgemäß erhältlichen Verbindungen, dem (Beta-Asp-Alpha-anilid)<sup>6</sup>-LH-RH, konnte die Samen- und Testosteronproduktion von Truthähnen besser und anhaltender gesteigert werden als zum Beispiel mit dem strukturanalogen D-Phe<sup>6</sup>-LH-RH. Die gleiche Verbindung verkürzte die Setzzeit (die Zeit, während der die Henne bereit ist zu brüten) von Truthennen beträchtlich, während natives LH-RH wirkungslos war.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die erfindungsgemäß hergestellten Gonadoliberinanaloga auf die Vermehrungsvorgänge der Wirbeltiere eine große Wirkung ausüben. Die Vorteile der Anwendung der Verbindungen in der Tierzucht sind durch zahlreiche Versuche belegt.

Der bedeutende Vorteil der neuen Verbindungen der allgemeinen Formel (I) gegenüber den bisher bekannten hochwirksamen Gonadoliberinanaloga besteht darin, daß erstere ausschließlich aus L-Aminosäuren aufgebaut sind. Auch ist ihre Ovulation auslösende und Testosteron freisetzende Wirkung, wie zahlreiche biologische Experimente zeigten, besser als die der in 6-Stellung Glycin oder eine D-Aminosäure enthaltenden sog. superaktiven Gonadoliberinderivate.

Die in den Arbeitsvorschriften und Beispielen angegebenen  $R_f$ -Werte der Dünnschichtchromatographie wurden an Merck-Fertigplatten (Kieselgel DC, Alufolie) mit den folgenden Lösungsmittelgemischen bestimmt:

	1. Äthylacetat-Pyridin-Essigsäure-Wasser	60:20:6:11
	2. Äthylacetat-Pyridin-Essigsäure-Wasser	120:20:6:11
	3. Äthylacetat-Pyridin-Essigsäure-Wasser	240:20:6:11
15	4. Äthylacetat-Pyridin-Essigsäure-Wasser	480:20:6:11
	5. Äthylacetat-Pyridin-Essigsäure-Wasser	30:20:6:11
	6. Aceton-Chloroform	1:15
	7. Aceton-Toluol	1:1
	8. Essigsäure-Benzol	1:7
20	9. n-Butanol-Essigsäure-Äthylacetat-Wasser	1:1:1:1
	10. n-Butanol-Essigsäure-Wasser	4:1:1
	11. n-Butanol-Essigsäure-Wasser	4:1:5 (Oberphase)
	12. Äthylacetat-Pyridin-Essigsäure-Wasser	5:5:1:3
25	13. Butanol-Pyridin-Essigsäure-Wasser	60:20:6:11

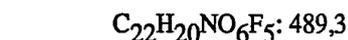
Die Schmelzpunkte sind in °C angegeben und nicht korrigiert.

Die Synthese einiger Asparaginsäurederivate der Formel (VIII), welche zur Herstellung von Ausgangsverbindungen der Formel (II) eingesetzt werden, ist in den folgenden Arbeitsvorschriften illustriert:

30 Arbeitsvorschrift 1:

a) BOC-Asp(OBzl)-OPFP

3,23 g (10 mMol) tert.-Butyloxycarbonyl-asparaginsäure-Beta-benzylester werden in 50 ml Äthylacetat gelöst. Die Lösung wird auf 0°C gekühlt und unter Rühren mit 1,84 g (10 mMol) Pentafluorphenol und 2,26 g (11 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid versetzt. Das Gemisch wird bei 0°C 30 Minuten lang und dann bei Raumtemperatur 12 Stunden lang gerührt. Nach dem Filtrieren wird die Lösung im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wird in 15 ml Äther gelöst und durch Zusatz von 15 ml Petroläther bei -20°C kristallisiert. Ausbeute: 3,75 g (70 %).



Schmelzpunkt: 84°C

$[\text{Alpha}]_D^{22}$ : -18,1° (c = 1, Äthylacetat)

45  $R_f$  (7) = 0,9;  $R_f$  (4) = 0,95

b) BOC-Asp(OBzl)-NH<sub>2</sub>

50 Zu der mit 10 ml Methanol bereiteten Lösung von 970 mg (2 mMol) tert.- Butyloxycarbonyl-asparaginsäure-Beta-benzyl-ester-Alpha-pentafluorphenylester werden 10 ml bei 0°C mit Ammoniak gesättigten Methanols gegeben. Die Lösung wird bei 0°C 30 Minuten lang gerührt und dann im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wird aus einem Gemisch von Methanol und Äther kristallisiert.

Elementaranalyse für  $C_{16}H_{22}N_2O_5$  (322,1)

55	berechnet, %:	C 59,62	H 6,83	N 8,69
	gefunden, %:	C 59,2	H 6,98	N 8,8

Schmelzpunkt: 159-161°C

60  $[\text{Alpha}]_D^{22}$ : +1,1° (c = 1, Methanol)

Rf (7) = 0,5; Rf (8) = 0,75; Rf (4) = 0,9; Rf (6) = 0,95

5 c) BOC-Asp-NH<sub>2</sub>

480 mg (1,5 mMol) tert.-Butyloxycarbonyl-asparaginsäure-Beta-benzylester-Alpha-amid werden in 10 ml Methanol gelöst und in Gegenwart von 50 mg 10 %iger Palladiumaktivkohle eine Stunde lang hydriert. Der Katalysator wird abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird aus wäbrigem Äthanol kristallisiert. Ausbeute: 246 mg (93 %).

10

C<sub>9</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 232,2

Schmelzpunkt: 145-146°C

15 [Alpha]<sup>22</sup><sub>D</sub>: -2,2° (c = 1, Methanol)

Rf (7) = 0,05; Rf (8) = 0,2; Rf (4) = 0,3; Rf (6) = 0,1

20 Arbeitsvorschrift 2:

a) BOC-Asp(OBzl)-Alpha-[2-(4-chlorphenyl)-isobutylamid

5 g (15 mMol) tert.-Butyloxycarbonyl-asparaginsäure-Beta-benzylester werden in 100 ml Äthylacetat gelöst. Die Lösung wird auf 0°C gekühlt und unter Rühren mit 2,1 g N-Hydroxybenzotriazol, 3,75 g Dicyclohexylcarbodiimid und der mit 20 ml Dimethylformamid bereiteten Lösung von 3,5 g 2-(4-Chlorphenyl)-isobutylamin versetzt. Das Gemisch wird bei Raumtemperatur 12 Stunden lang gerührt und dann filtriert. Das Filtrat wird mit 10 %iger Citronensäure, dann mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und schließlich mit gesättigter Kochsalzlösung ausgeschüttelt, dann über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum eingedampft. Der ölige Rückstand kristallisiert langsam. Die Kristalle werden mit einem Gemisch aus Äther und Petroläther gewaschen und dann getrocknet. Ausbeute: 5,5 g (75 %).

30

C<sub>26</sub>H<sub>33</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>Cl: 488,2

Schmelzpunkt: 60-61°C

35 [Alpha]<sup>22</sup><sub>D</sub>: -12,2° (c = 1, Methanol)

Rf (7) = 0,75; Rf (8) = 0,6

40 b) BOC-Asp-FBA

2,3 g (4,7 mMol) tert.-Butyloxycarbonyl-asparaginsäure-Beta-benzylester-Alpha-[2-(chlorphenyl)-isobutylamid] werden in 30 ml Methanol gelöst und in Gegenwart von 200 mg 10 %iger Palladiumaktivkohle 2 Stunden lang hydriert. Der Katalysator wird abfiltriert und das Filtrat im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wird mit Äther verrieben, in Methanol gelöst und durch Zusatz von Äther kristallisiert. Ausbeute: 1,5 g (87 %).

45

Elementaranalyse für C<sub>19</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (364,2)

berechnet, %:	C 62,63	H 7,69
gefunden, %:	C 62,3	H 7,58

50

Schmelzpunkt: 94-96°C

[Alpha]<sup>22</sup><sub>D</sub>: -19° (c = 1, Methanol)

55 Rf (3) = 0,2; Rf (2) = 0,3; Rf (7) = 0,15; Rf (8) = 0,8; Rf (10) = 0,15.

Arbeitsvorschrift 3:

## a) BOC-Asp(OBzl)-CBA

2,4 g (5 mMol) des gemäß Arbeitsvorschrift 1a) hergestellten tert.-Butyloxycarbonyl-asparaginsäure-Beta-benzylester-Alpha-penta-fluorphenylesters werden in 20 ml Äthylacetat gelöst. Die Lösung wird auf 0°C gekühlt und tropfenweise mit der gekühlten Lösung von 0,42 ml (5 mMol) Cyclobutylamin in 2 ml Äthylacetat versetzt. Das Reaktionsgemisch wird bei Raumtemperatur 2 Stunden lang gerührt, dann mit 10 %iger Citronensäure, anschließend mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und schließlich mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, dann über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wird in Äther gelöst und durch Zusatz von Petroläther kristallisiert. Ausbeute: 1,16 g (89 %).



Schmelzpunkt: 84-86°C

$[\text{Alpha}]_D^{22}$ : -5,7° (c = 1, Methanol)

Rf (8) = 0,9; Rf (10) = 0,9; Rf (7) = 0,75; Rf (11) = 0,95

## b) BOC-Asp-CBA

1 g (2,65 mMol) tert.-Butyloxycarbonyl-asparaginsäure-Beta-benzylester-Alpha-cyclobutylamid wird in 20 ml Methanol gelöst und in Gegenwart von 100 mg 10 %iger Palladiumaktivkohle 2 Stunden lang hydriert. Nach dem Abfiltrieren des Katalysators wird die Lösung im Vakuum eingedampft und der Rückstand aus wäßrigem Äthanol kristallisiert. Ausbeute: 600 mg (79 %).

Elementaranalyse für  $C_{13}H_{22}N_2O_5$  (286, 1)

berechnet, %:	C 54,54	H 7,69
gefunden, %:	C 53,9	H 7,68

Schmelzpunkt: 149-150°C

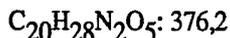
$[\text{Alpha}]_D^{22}$ : -9,5° (c = 1, Methanol)

Rf (8) = 0,2; Rf (10) = 0,75; Rf (7) = 0,05.

Arbeitsvorschrift 4:

## a) BOC-Asp(OBzl)-PIR

3,2 g (10 mMol) tert.-Butyloxycarbonyl-asparaginsäure-Beta-benzylester werden in 5 ml Äthylacetat gelöst. Die Lösung wird bei 0°C mit 1,35 g N-Hydroxybenzotriazol, 2,26 g Dicyclohexyl-carbodiimid und der mit 2 ml Äthylacetat bereiteten Lösung von 0,8 ml Pyrrolidin versetzt. Das Reaktionsgemisch wird bei Raumtemperatur 2 Stunden lang gerührt und dann mit 10 %iger Citronensäure, danach mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und schließlich mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen. Die organische Phase wird über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wird in Äther gelöst, filtriert und erneut eingedampft. 3,4 g (90 %) eines Öls werden erhalten.



$[\text{Alpha}]_D^{22}$ : -84,4° (c = 1, Methanol)

Rf (7) = 0,75; Rf (4) = 0,95; Rf (8) = 0,85; Rf (6) = 0,8

## b) BOC-Asp-PIR

3 g (8 mMol) tert.-Butyloxycarbonyl-asparaginsäure-Beta-benzylester-Alpha-pyrrolidin werden in 30 ml Methanol gelöst und in Gegenwart von 250 mg 10 %iger Palladiumaktivkohle 2 Stunden lang hydriert. Nach dem Abfiltrieren des Katalysators wird die Lösung eingedampft. Der ölige Rückstand wird über Schwefelsäure getrocknet. Ausbeute: 2,1 g (92 %)

$C_{13}H_{22}N_2O_5$ : 286,2

Schmelzpunkt: 124-125°C

$[\alpha]_D^{22}$ : -39,9° (c = 1, Methanol)

Rf (8) = 0,3; Rf (7) = 0,2

Arbeitsvorschrift 5:

a) BOC-Asp(OBzl)-IND

3,23 g (10 mMol) tert.-Butyloxycarbonyl-asparaginsäure-Beta-benzylester werden in 50 ml Äthylacetat gelöst. Die Lösung wird auf 0°C gekühlt und unter Rühren mit 2,3 g Dicyclohexyl-carbodiimid und 1,19 g Indolin versetzt. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, anderntags filtriert und das Filtrat dreimal mit 10 %iger Citronensäure, dreimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und schließlich dreimal mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen. Die Lösung wird über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und dann eingedampft. Das zurückbleibende Öl wird mit Wasser aus Äthanol kristallisiert. Ausbeute: 3,7 g (89 %)

$C_{24}H_{28}N_2O_5$ : 424,1

Schmelzpunkt: 75-76°C

$[\alpha]_D^{22}$ : -70,9° (c = 1, Äthanol)

Rf (7) = 0,9

Arbeitsvorschrift 6:

a) BOC-Asp(OBzl)-ANI

2,23 g (10 mMol) tert.-Butyloxycarbonyl-asparaginsäure-Beta-benzylester werden in 50 ml Äthylacetat gelöst. Die Lösung wird auf 0°C gekühlt und mit 0,96 g Anilin sowie 2,26 g Dicyclohexyl-carbodiimid versetzt. Das Gemisch wird bei Raumtemperatur 6 Stunden lang gerührt und dann filtriert. Das Filtrat wird mit 10 %iger Citronensäure, dann mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und schließlich mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingedampft. Die beim Eindampfen erhaltenen Kristalle werden mit Petroläther verrieben, filtriert und getrocknet. Ausbeute: 4 g (96 %)

$C_{22}H_{26}N_2O_5$ : 398,3

Schmelzpunkt: 105-106°C

$[\alpha]_D^{22}$ : -6° (c = 1, Dimethylformamid)

Rf (11) = 0,8; Rf (12) = 0,95; Rf (8) = 0,4

b) BOC-Asp-ANI

3 g tert.-Butyloxycarbonyl-asparaginsäure-Beta-benzylester-Alpha-anilid werden in 20 ml Methanol gelöst und in Gegenwart von 300 mg 10 %iger Palladiumaktivkohle hydriert. Der Katalysator wird abfiltriert, das Lösungsmittel im Vakuum eingedampft und der Rückstand aus Äthanol durch Zusatz von Wasser kristallisiert. Ausbeute: 2,05 g (88 %).

Elementaranalyse für  $C_{15}H_{20}N_2O_5$  (308,2)

berechnet, %:	C 58,44	H 6,49
gefunden, %:	C 58,6	H 6,56

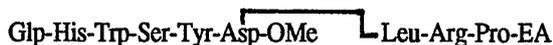
Schmelzpunkt: 157-158°C

[Alpha]<sup>22</sup><sub>D</sub>: -12° (c = 1, Dimethylformamid)

Rf (11) = 0,7; Rf (12) = 0,85; Rf (8) = 0,05

Das erfindungsgemäße Verfahren wird durch die folgenden Beispiele noch näher erläutert:

Beispiel 1



a) Z-Asp-OMe — Leu-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-EA

537 mg (1 mMol) des Hydrobromids von H-Leu-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-EA werden in 10 ml Dimethylformamid gelöst. Die Lösung wird bei 0°C mit 447 mg (1 mMol) Z-Asp(OPFP)-OMe versetzt. Der pH-Wert des Reaktionsgemisches wird unter Rühren mit Triäthylamin auf 8 eingestellt. Nach 6 Stunden wird die Lösung im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wird zuerst mit Äther, dann mit Wasser verrieben, dann filtriert und schließlich aus methanolischer Lösung durch Zugabe von Äther ausgefällt. Man erhält 440 mg (62 %) einer weißen, amorphen Substanz.

C<sub>32</sub>H<sub>49</sub>N<sub>9</sub>O<sub>10</sub>: 719,6

Schmelzpunkt: 182-184°C

[Alpha]<sup>22</sup><sub>D</sub>: -58,4° (c = 1, Methanol)

Rf (2) = 0,5; Rf (9) = 0,85; Rf (12) = 0,9.

b) H-Asp-OMe — Leu-Arg-Pro-EA · 2AcOH

400 mg (0,56 mMol) des Tetrapeptids Z-Asp-OMe — Leu-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-EA werden in 20 ml 50 %iger Essigsäure gelöst und in Gegenwart von 50 mg 10 %iger Palladiumaktivkohle 4 Stunden lang hydriert. Der Katalysator wird abfiltriert, die Essigsäure im Vakuum entfernt, der Rückstand mit Äther verrieben, filtriert und im Vakuum getrocknet. Ausbeute: 360 mg (97 %).

C<sub>28</sub>H<sub>52</sub>N<sub>8</sub>O<sub>10</sub>: 660,5

Rf (1) = 0,15; Rf (9) = 0,6; Rf (10) = 0,25; Rf (5) = 0,45

c) Glp-His-Trp-Ser-Tyr-Asp-OMe — Leu-Arg-Pro-EA

716 mg (1 mMol) des Pentapeptid-hydrazids Glp-His-Trp-Ser-Tyr-N<sub>2</sub>H<sub>3</sub> werden in 20 ml Dimethylformamid gelöst. Die Lösung wird auf -10°C gekühlt und zuerst mit 0,7 ml 6n Salzsäure, dann mit der konzentrierten wäßrigen Lösung von 75 mg Natriumnitrit versetzt. Das Gemisch wird bei -5°C 10 Minuten lang gerührt. Dann

gibt man die aus 660 mg (1 mMol) des Diacetats von H-Asp-OMe — Leu-Arg-Pro-EA, 0,7 ml Triäthylamin und 5 ml Dimethylformamid bereitete, gekühlte Lösung zu dem Gemisch. Notwendigenfalls wird der pH-Wert mit Triäthylamin auf 8 eingestellt. Das Gemisch wird bei -5°C eine Stunde lang, dann bei 0°C 12 Stunden lang gerührt und anschließend das Dimethylformamid im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird mit Äther verrieben, filtriert und dann an einer Säule aus Sephadex G-25 (Ionenaustauscher auf Dextranbasis) mit 0,2 n Essigsäure fraktioniert. Die das Hauptprodukt enthaltenden Fraktionen werden an einer Mitteldruck-Umkehrphasensäule (Silikagel C<sub>18</sub>, Whatman, LRP-1) mit 30 % Wasser enthaltendem Methanol chromatographiert. Die reinen Fraktionen werden lyophilisiert. Ausbeute: 712 mg (58 %).

$C_{58}H_{80}N_{16}O_{14}$ : 1225

$[\text{Alpha}]_D^{22}$ :  $-53,4^\circ$  (c = 1, Wasser)

5 Rf (5) = 0,5; Rf (10) = 0,15; Rf (9) = 0,7

Aminosäureanalyse: Glu: 1,02, His: 0,97, Ser: 0,95, Tyr: 1,01, Asp: 1,07, Leu: 1,00, Pro: 0,93.

10 Beispiel 2



15 a) BOC-Asp(OBzl)-DEA

3,23 g (10 mMol) tert.-Butyloxycarbonyl-asparaginsäure-Beta-benzylester werden bei  $0^\circ\text{C}$  in 100 ml Dimethylformamid gelöst. Zu der Lösung werden 1,35 g (10 mMol) N-Hydroxybenztriazol und 2,26 g (11 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid gegeben. Das Gemisch wird bei  $0^\circ\text{C}$  15 Minuten lang gerührt und dann unter Rühren tropfenweise mit der Lösung von 1,0 mg (0,73 g; 10 mMol) Diäthylamin in 20 ml Äthylacetat versetzt. Das Reaktionsgemisch wird bei  $0^\circ\text{C}$  noch 30 Minuten, dann bei Raumtemperatur 4 Stunden lang gerührt. Der Niederschlag wird abfiltriert. Die Mutterlauge wird eingedampft, der Rückstand in Äthylacetat gelöst und die Lösung mit 10 %iger kalter Citronensäure, dann mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und schließlich mit gesättigter Kochsalzlösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingedampft. Man erhält 3,6 g (95 %) eines blaßgelben Öls.

25  $C_{20}H_{30}N_2O_5$ : 378,2

$[\text{Alpha}]_D^{22}$ :  $-58,4^\circ$  (c = 1, Methanol)

30 Rf (4) = 0,95; Rf (6) = 0,95; Rf (7) = 0,75

b) BOC-Asp-DEA

3,8 g (10 mMol) tert.-Butyloxycarbonyl-aspartyl-Beta-benzylester-Alpha-diäthylamid werden in 50 ml Methanol gelöst und in Gegenwart von 300 mg 10 %iger Palladiumaktivkohle 2 Stunden lang hydriert. Der Katalysator wird abfiltriert, die Lösung eingedampft und der Rückstand im Exsikkator getrocknet. Man erhält 2,8 g (100 %) einer blaßgelben schaumigen Substanz.

40  $C_{13}H_{25}N_2O_5$ : 289,1

$[\text{Alpha}]_D^{22}$ :  $-60,1^\circ$  (c = 1, Methanol)

Rf (4) = 0,7; Rf (6) = 0,9; Rf (8) = 0,8

45 c) BOC-Asp(OPFP)-DEA

2,9 g (10 mMol) tert.-Butyloxycarbonyl-asparaginsäure-Alpha-diäthylamid werden bei  $0^\circ\text{C}$  unter Rühren in 100 ml Äthylacetat gelöst. Zu der Lösung werden 1,84 g (10 mMol) Pentafluorphenol und 2,26 g (11 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid gegeben. Das Reaktionsgemisch wird bei  $0^\circ\text{C}$  30 Minuten lang und dann bei Raumtemperatur 24 Stunden lang gerührt. Der Niederschlag wird abfiltriert, das Filtrat eingedampft, der Rückstand mit Petroläther behandelt, der ausgeschiedene Niederschlag erneut abfiltriert und die Lösung dann eingedampft. Nach dem Trocknen erhält man 4,4 g (99 %) eines farblosen Öls.

55  $C_{19}H_{24}N_2O_5F_5$ : 455,1

$[\text{Alpha}]_D^{22}$ :  $-75,0^\circ\text{C}$  (c = 1, Methanol)

Rf (8) = 0,95; Rf (6) = 0,9; Rf (4) = 0,75; Rf (7) = 0,8

d)  $\text{BOC-Asp-DEA} \text{---} \text{Leu-Arg(NO}_2\text{)-Pro-EA}$

5 536 mg (1 mMol) des Hydrobromids von H-Leu-Arg(NO<sub>2</sub>)-Proäthylamid werden in 5 ml Dimethylformamid gelöst. Die Lösung wird auf 0°C gekühlt und zuerst mit 0,14 ml (1 mMol) Triäthylamin, dann mit 453 mg (1 mMol) tert.-Butyloxycarbonyl-aspartyl-Alpha-diäthylamid-Beta-pentafluorphenylester versetzt. Das Reaktionsgemisch wird bei Raumtemperatur 5 Stunden lang gerührt, und dabei wird der pH-Wert von Zeit zu Zeit auf neutral gestellt. Das Reaktionsgemisch wird eingedampft, der Rückstand mit Äther verrieben und dann  
10 filtriert. Das erhaltene Rohprodukt (etwa 780 mg) wird an einer Silikagelsäule mit dem im Verhältnis 4:1:1 bereiteten Gemisch von Butanol, Essigsäure und Wasser chromatographisch gereinigt. Die entsprechenden Fraktionen werden gesammelt und im Vakuum zur Trockne eingedampft. Durch Verreiben des Rückstandes mit Äther erhält man 470 mg (64 %) eines weißen Pulvers.

15  $\text{C}_{32}\text{H}_{57}\text{N}_{10}\text{O}_9$ : 725,6

$[\text{Alpha}]_{\text{D}}^{22}$ : -77,2° (c = 1, Methanol)

Schmelzpunkt: 132-133°C

20

Rf (2) = 0,4; Rf (9) = 0,85; Rf (10) = 0,55

25 e)  $\text{BOC-Asp-DEA} \text{---} \text{Leu-Arg-Pro-EA} \cdot \text{AcOH}$

730 mg (1 mMol) des Tetrapeptids  $\text{BOC-Asp-DEA} \text{---} \text{Leu-Arg(NO}_2\text{)-Pro-EA}$  werden in 20 ml 50 %iger Essigsäure gelöst und in Gegenwart von 100 mg 10 %iger Palladiumaktivkohle 3 Stunden lang hydriert. Das  
30 durch Eindampfen des Gemisches gewonnene Produkt ist ein chromatographisch einheitliches Öl.

$\text{C}_{34}\text{H}_{63}\text{N}_9\text{O}_9$ : 741,6

Rf (2) = 0,05; Rf (9) = 0,65; Rf (1) = 0,6

35

f)  $\text{H-Asp-DEA} \text{---} \text{Leu-Arg-Pro-EA} \cdot 2\text{TFA}$

40

740 mg (1 mMol) des Tetrapeptids  $\text{BOC-Asp-DEA} \text{---} \text{Leu-Arg-Pro-EA}$  werden in 10 ml Trifluoressigsäure gelöst. Die Lösung wird bei Raumtemperatur 15 Minuten lang gerührt und dann im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wird mit Äther verrieben, filtriert und über Lauge getrocknet. Man erhält 780 mg (96 %) einer schwach hygroskopischen Substanz.

45

$\text{C}_{31}\text{H}_{53}\text{O}_9\text{N}_9\text{F}_6$ : 809,2

$[\text{Alpha}]_{\text{D}}^{22}$ : -40,6° (c = 1, Wasser)

50

Rf (11) = 0,2; Rf (5) = 0,4

g)  $\text{Glp-His-Trp-Ser-Tyr-Asp-DEA} \text{---} \text{Leu-Arg-Pro-EA} \cdot 2\text{AcOH}$

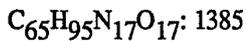
55

286 mg (0,4 mMol) des Pentapeptidhydrazids  $\text{Glp-His-Trp-Ser-Tyr-N}_2\text{H}_3$  werden in 25 ml Dimethylformamid gelöst. Die Lösung wird auf -10°C gekühlt und unter Rühren tropfenweise zuerst mit 0,27 ml 6n Salzsäure, dann mit der konzentrierten wäßrigen Lösung von 30,2 mg Natriumnitrit versetzt. Nach 5 Minuten

werden 353 mg des Trifluoracetats von  $\text{H-Asp-DEA} \text{---} \text{Leu-Arg-Pro-EA}$  in Form einer mit 1 ml

Dimethylformamid und 0,27 ml Triäthylamin bereiteten, auf -10°C gekühlten Lösung zugegeben. Erforderlichen falls wird das Reaktionsgemisch mit Triäthylamin neutralisiert und bei -5°C eine Stunde, bei 0°C eine weitere Stunde und schließlich bei Raumtemperatur 12 Stunden lang gerührt.

Das Dimethylformamid wird im Vakuum entfernt und der Rückstand an einer Silikagelsäule mit dem im Verhältnis 30:20:6:11 bereiteten Gemisch von Äthylacetat, Pyridin, Essigsäure und Wasser chromatographisch gereinigt. Die entsprechenden Fraktionen werden gesammelt, im Vakuum eingedampft, der Rückstand wird mit Äther verrieben, abfiltriert und getrocknet. Man erhält 290 mg (50 %) eines weißen Pulvers.



10

Schmelzpunkt: 180-181°C

$[\text{Alpha}]_D^{22} = -64,2^\circ$  (c = 1, Methanol)

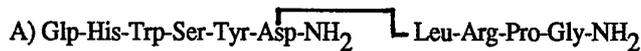
15

Rf (12) = 0,85; Rf (5) = 0,35; Rf (11) = 0,25

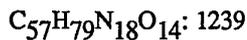
Aminosäureanalyse: Asp: 1,0, Ser: 0,99, Glu: 1,01, Leu: 1,10, Tyr: 1,00, Eis: 0,92, Arg: 0,98

Analog zu den Beispielen 1 und 2 wurden folgende neue Derivate der allgemeinen Formel I erhalten:

20



25



$[\text{Alpha}]_D^{22} = -55,5^\circ$  (c = 1, Wasser)

30

Rf (5) = 0,35; Rf (11) = 0,15; Rf (9) = 0,65; Rf (13) = 0,15

Aminosäureanalyse: Glu: 0,96, His: 1,04, Ser: 0,93, Tyr: 1,02, Leu: 1,02, Pro: 0,94, Gly: 1,00, Asp: 1,1

35



$[\text{Alpha}]_D^{22} = -65,4^\circ$  (c = 1, Wasser)

40

Rf (13) = 0,25; Rf (9) = 0,7; Rf (11) = 0,2; Rf (5) = 0,5

Aminosäureanalyse: Glu: 0,97, His: 1,05, Ser: 0,94, Tyr: 1,02, Asp: 1,02, Leu: 1,01, Pro: 0,95, Gly: 1,00

45



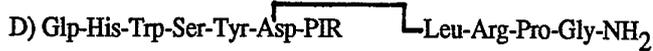
50

$[\text{Alpha}]_D^{22} = -44,88^\circ$  (c = 1, Wasser)

Rf (11) = 0,2; Rf (9) = 0,7; Rf (13) = 0,2; Rf (5) = 0,4

55

Aminosäureanalyse: Glu: 1,05, His: 0,96, Ser: 0,94, Tyr: 0,98, Asp: 1,07, Leu: 1,02, Pro: 0,96, Gly: 1,00.



C<sub>61</sub>H<sub>85</sub>N<sub>18</sub>O<sub>14</sub>: 1293

5 [Alpha]<sup>22</sup><sub>D</sub>: -53,2° (c = 1, Wasser)

Rf (13) = 0,15; Rf (9) = 0,6; Rf (11) = 0,2; Rf (5) = 0,4

10 Aminosäureanalyse: Glu: 0,97; His: 1,01, Ser: 0,94, Tyr: 1,03, Asp: 1,05, Leu: 1,00, Pro: 0,94



15 C<sub>65</sub>H<sub>85</sub>N<sub>17</sub>O<sub>13</sub>: 1311

[Alpha]<sup>22</sup><sub>D</sub>: -39,6° (c = 0,25, 25 %ige Essigsäure)

20 Rf (13) = 0,8; Rf (9) = 0,75; Rf (5) = 0,7; Rf (10) = 0,5



25 C<sub>63</sub>H<sub>83</sub>N<sub>18</sub>O<sub>14</sub>: 1315

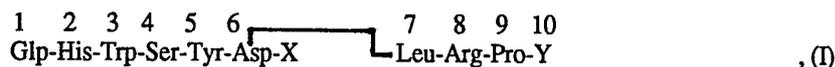
[Alpha]<sup>22</sup><sub>D</sub>: -58,3° (c = 1, Wasser)

30 Rf (9) = 0,5; Rf (10) = 0,2; Rf (12) = 0,8

Aminosäureanalyse: NH<sub>3</sub>: 1,23, Arg: 0,95, Asp: 1,1, Glu: 1,08, Pro: 1,01, Gly: 1,00, Leu: 1,1, Tyr: 0,85,  
Ser: 0,99

40 PATENTANSPRÜCHE

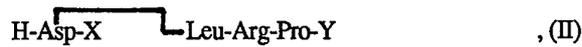
45 1. Verfahren zur Herstellung von neuen Gonadoliberin-Derivaten der allgemeinen Formel



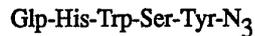
worin

X für eine Gruppe der allgemeinen Formel -O-R, in der R Benzyl oder C<sub>1</sub>- bis C<sub>4</sub>-Alkyl bedeutet, oder für einen Rest der allgemeinen Formel -NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub> steht, in welchem letzterem R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub> unabhängig voneinander Wasserstoff, C<sub>1</sub>- bis C<sub>5</sub>-Alkyl, C<sub>3</sub>- bis C<sub>6</sub>-Cycloalkyl, Aryl, im Alkylteil 1 oder 2 Kohlenstoffatome enthaltendes Aralkyl darstellen oder gemeinsam mit dem angrenzenden Stickstoffatom eine Morpholino-, 1-Indoliny- oder 1-Pyrrolidinylgruppe bilden und

Y für eine Glycinamid- oder für eine Alkylamidgruppe mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen steht, sowie von deren Säureadditionssalzen, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Tetra- oder Pentapeptid der allgemeinen Formel



5 worin die Bedeutung von X und Y die gleiche wie oben ist, oder ein Salz davon mit dem Pentapeptidazid der Formel



10 kondensiert, gewünschtenfalls ein erhaltenes Nona- bzw. Decapeptidamid der Formel (I) durch Umsetzen mit einer physiologisch verträglichen Säure in ein Säureadditionssalz überführt oder aus einem erhaltenen Säureadditionssalz durch Umsetzen mit einer Base das Derivat der Formel (I) freisetzt und gewünschtenfalls aus einem erhaltenen Nona- bzw. Decapeptidamid der Formel (I) einen Metallkomplex bildet.

15

2. Verfahren nach Anspruch 1 zur Herstellung des neuen Derivates



20

und von Säureadditionssalzen davon, **dadurch gekennzeichnet**, daß man

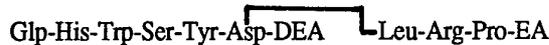


25

mit dem Pentapeptidazid umsetzt.

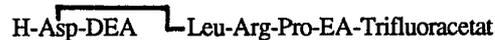
3. Verfahren nach Anspruch 1 zur Herstellung des neuen Derivates

30



und von Säureadditionssalzen davon, **dadurch gekennzeichnet**, daß man

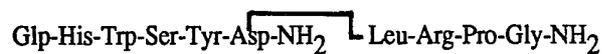
35



mit dem Pentapeptidazid umsetzt.

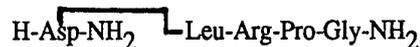
40

4. Verfahren nach Anspruch 1 zur Herstellung des neuen Derivates



45

und von Säureadditionssalzen davon, **dadurch gekennzeichnet**, daß man



50

mit dem Pentapeptidazid umsetzt.

5. Verfahren nach Anspruch 1 zur Herstellung des neuen Derivates

55



und von Säureadditionssalzen davon, **dadurch gekennzeichnet**, daß man

60



mit dem Pentapeptidazid umgesetzt.

5 6. Verfahren nach Anspruch 1 zur Herstellung des neuen Derivates



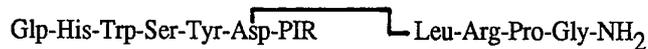
10 und von Säureadditionssalzen davon, **dadurch gekennzeichnet**, daß man



15 mit dem Pentapeptidazid umgesetzt.

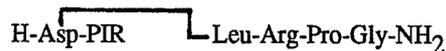
7. Verfahren nach Anspruch 1 zur Herstellung des neuen Derivates

20



und von Säureadditionssalzen davon, **dadurch gekennzeichnet**, daß man

25



mit dem Pentapeptidazid umgesetzt.

30

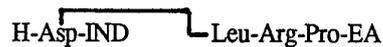
8. Verfahren nach Anspruch 1 zur Herstellung des neuen Derivates

35



und von Säureadditionssalzen davon, **dadurch gekennzeichnet**, daß man

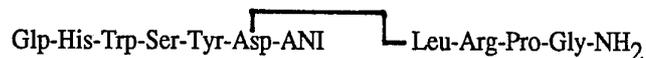
40



mit dem Pentapeptidazid umgesetzt.

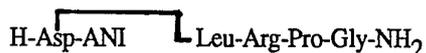
9. Verfahren nach Anspruch 1 zur Herstellung des neuen Derivates

45



und von Säureadditionssalzen davon, **dadurch gekennzeichnet**, daß man

50



mit dem Pentapeptidazid umgesetzt.

55