



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
 BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑤¹ Int. Cl.³: C 07 C 103/52

①⁹

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



①¹

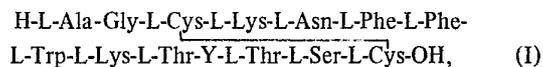
⑫ **PATENTSCHRIFT** A5

632 486

<p>⑳ Gesuchsnummer: 9359/77</p> <p>㉒ Anmeldungsdatum: 28.07.1977</p> <p>③① Priorität(en): 28.07.1976 US 709465</p> <p>㉔ Patent erteilt: 15.10.1982</p> <p>④⑤ Patentschrift veröffentlicht: 15.10.1982</p>	<p>⑦③ Inhaber: Eli Lilly and Company, Indianapolis/IN (US)</p> <p>⑦② Erfinder: James Edwin Shields, Indianapolis/IN (US)</p> <p>⑦④ Vertreter: E. Blum & Co., Zürich</p>
---	---

⑤④ **Verfahren zur Herstellung von Tetradecapeptiden.**

⑤⑦ Eine neue Verbindung der Formel I

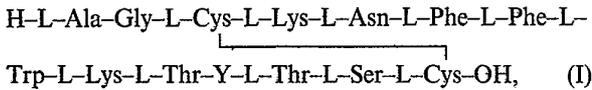


worin Y D-Phe, L-Cha oder L-Leu bedeutet, und ihrer pharmazeutisch annehmbaren nichttoxischen Säureadditionssalze, wird erhalten, indem das entsprechende geradkettige Tetradecapeptid der Formel III, H-L-Ala-Gly-L-Cys-L-Lys-L-Asn-L-Phe-L-Phe-L-Trp-L-Lys-L-Thr-Y-L-Thr-L-Ser-L-Cys-OH, mit einem Oxidationsmittel umgesetzt wird.

Die Verbindungen der Formel I inhibieren im allgemeinen die Freisetzung von Wachstumshormonen. Diese inhibitorische Wirkung ist beispielsweise in den Fällen von Vorteil, in denen das behandelte Lebewesen wegen einer übermässigen Sekretion von Somatotropin einer therapeutischen Behandlung bedarf; eine derartige Sekretion ist mit krankhaften Zuständen, zum Beispiel juvenilem Diabetes und Acromegalie, verbunden. L-Leu¹¹ - Somatostatin zeigt beispielsweise auch eine inhibierende Wirkung auf die Pankreassekretion von Insulin.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Herstellung einer neuen Verbindung der Formel I



worin Y D-Phe, L-Cha oder L-Leu bedeutet, und ihrer pharmazeutisch annehmbaren nichttoxischen Säureadditionssalze, dadurch gekennzeichnet, dass das entsprechende geradkettige Tetradecapeptid der Formel III, H-L-Ala-Gly-L-Cys-L-Lys-L-Asn-L-Phe-L-Phe-L-Trp-L-Lys-L-Thr-Y-L-Thr-L-Ser-L-Cys-OH₂, mit einem Oxidationsmittel umgesetzt wird.

2. Verfahren nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass ein geradkettiges Tetradecapeptid verwendet wird, in dessen Formel Y D-Phe bedeutet.

3. Verfahren nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass ein geradkettiges Tetradecapeptid verwendet wird, in dessen Formel Y L-Cha bedeutet.

4. Verfahren nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass ein geradkettiges Tetradecapeptid verwendet wird, in dessen Formel Y L-Leu bedeutet.

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von neuen Tetradecapeptiden der Formel I

L-Ala-Gly-L-Cys-L-Lys-L-Asn-L-Phe-L-Phe-L-Trp-L-Lys-L-Thr-Y-L-Thr-L-Ser-L-Cys-OH, Formel I, worin Y L-Cha, L-Leu oder D-Phe bedeutet, und ihrer pharmazeutisch annehmbaren Säureadditionssalze.

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

L-Ala-Gly-L-Cys-L-Lys-L-Asn-L-Phe-L-Phe-L-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Phe-L-Thr-L-Ser-L-Cys-OH. Dieses Tetradecapeptid wurde aus Schafhypothalamusextrakten isoliert, und seine Wirkung ist die einer Inhibierung der Sekretion von Wachstumshormon (GH), das auch als Somatotropin bekannt ist, vergleiche P. Brazeau, W. Vale, R. Burgus, N. Ling, M. Butcher, J. Rivier, and R. Guillemin, Science, Bd. 179, S. 77 (1973).

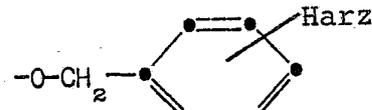
Die biologisch wirksamen Tetradecapeptide der oben angegebenen Formel I unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Struktur von der des Somatostatins durch das Vorhandensein eines D-Phenylalaninrestes, eines L-Cyclohexylalaninrestes oder eines L-Leucinrestes in Stellung 11 anstelle eines L-Phenylalaninrestes. Der Einfachheit halber werden die Tetradecapeptide der Formel I als D-Phe¹¹-Somatostatin, L-Cha¹¹-Somatostatin und L-Leu¹¹-Somatostatin bezeichnet.

Die während des erfindungsgemässen Verfahrens zur Herstellung der Tetradecapeptide der Formel I gebildeten Zwischenprodukte haben die Formel II

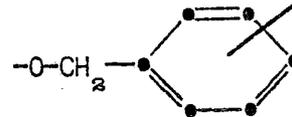
R-L-Ala-Gly-L-Cys(R₁)-L-Lys(R₂)-L-Asn-L-Phe-L-Phe-L-Trp(R₅)-L-Lys(R₂)-L-Thr(R₃)-Y-L-Thr(R₃)-L-Ser(R₄)-L-Cys(R₁)-X, Formel II; worin bedeuten:

- Y D-Phe, L-Cha oder L-Leu,
- R Wasserstoff oder eine alpha-Aminoschutzgruppe,
- R₁ Wasserstoff oder eine Thioschutzgruppe,

R₂ Wasserstoff oder eine epsilon-Aminoschutzgruppe, R₃ und R₄ Wasserstoff oder eine Hydroxyschutzgruppe, R₅ Wasserstoff oder eine Formylgruppe und X eine Hydroxylgruppe oder die Gruppe



in der «Harz» für Polystyrol steht, wobei die einzelnen Reste R, R₁, R₂, R₃, R₄ und R₅ Wasserstoff bedeuten, wenn X eine Hydroxylgruppe ist, und die anderen oben angegebenen Bedeutungen haben, wenn X für die Gruppe



steht.

Das erfindungsgemässe Verfahren zur Herstellung der neuen Tetradecapeptide der Formel I ist dadurch gekennzeichnet, dass das entsprechende geradkettige Tetradecapeptid der Formel III

L-Ala-Gly-L-Cys-L-Lys-L-Asn-L-Phe-L-Phe-L-Trp-L-Lys-L-Thr-Y-L-Thr-L-Ser-L-Cys-OH, worin Y die oben angegebene Bedeutung hat, mit einem Oxidationsmittel umgesetzt wird. Durch diese Umsetzung werden die beiden Sulfhydrylgruppen in eine Disulfidbrücke übergeführt.

Pharmazeutisch annehmbare nichttoxische Säureadditionssalze sind im allgemeinen Salze mit organischen oder anorganischen Säuren, wie Salzsäure, Schwefelsäure, Sulfonsäure, Weinsäure, Fumarsäure, Bromwasserstoffsäure, Glycolsäure, Zitronensäure, Maleinsäure, Phosphorsäure, Bernsteinsäure, Essigsäure, Salpetersäure, Benzoesäure, Ascorbinsäure, p-Toluolsulfonsäure, Benzolsulfonsäure, Naphthalinsulfonsäure und Propionsäure. Die bevorzugten Säureadditionssalze sind die mit Essigsäure hergestellten. Alle diese Salze können nach üblichen Methoden erhalten werden.

Die während des erfindungsgemässen Verfahrens gebildeten Zwischenprodukte haben die Formel II

R-L-Ala-Gly-L-Cys(R₁)-L-Lys(R₂)-L-Asn-L-Phe-L-Phe-L-Trp(R₅)-L-Lys(R₂)-L-Thr(R₃)-Y-L-Thr(R₃)-L-Ser(R₄)-L-Cys(R₁)-X, Formel II, worin die einzelnen Symbole die oben angegebenen Bedeutungen haben. Beispiele für diese Zwischenprodukte sind:

R-L-Ala-Gly-L-Cys(R₁)-L-Lys(R₂)-L-Asn-L-Phe-L-Phe-L-Trp(R₅)-L-Lys(R₂)-L-Thr(R₃)-D-Phe-L-Thr(R₃)-L-Ser(R₄)-L-Cys(R₁)-X;

R-L-Ala-Gly-L-Cys(R₁)-L-Lys(R₂)-L-Asn-L-Phe-L-Phe-L-Trp(R₅)-L-Lys(R₂)-L-Thr(R₃)-L-Cha-L-Thr(R₃)-L-Ser(R₄)-L-Cys(R₁)-X; und

R-L-Ala-Gly-L-Cys(R₁)-L-Lys(R₂)-L-Asn-L-Phe-L-Phe-L-Trp(R₅)-L-Lys(R₂)-L-Thr(R₃)-L-Leu-L-Thr(R₃)-L-Ser(R₄)-L-Cys(R₁)-X.

Ein bevorzugtes Zwischenprodukt hat die Formel

L-Ala-Gly-L-Cys-L-Lys-L-Asn-L-Phe-L-Phe-L-Trp-L-Lys-L-Thr-Y-L-Thr-L-Ser-L-Cys-OH, Formel III,

worin Y die oben angegebene Bedeutung hat. Zu weiteren bevorzugten Zwischenprodukten gehören die folgenden:

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

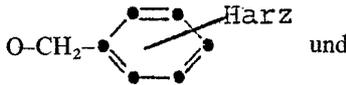
H-L-Ala-Gly-L-Cys-L-Lys-L-Asn-L-Phe-L-Phe-L-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Cha-L-Thr-L-Ser-L-Cys-OH;

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

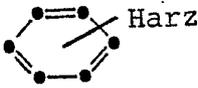
N-(BOC)-L-Ala-Gly-L-(PMB)Cys-L-(CbzOC)-Lys-L-Asn-L-Phe-L-Phe-L-Trp-L-(CbzOC)-Lys-L-(Bzl)Thr-D-Phe-L-(Bzl)Thr-L-(Bzl)Ser-L-(PMB)Cys-O-



N-(BOC)-L-Ala-Gly-L-(PMB)Cys-L-(CbzOC)-Lys-L-Asn-L-Phe-L-Phe-L-(For)Trp-L-(CbzOC)Lys-L-(Bzl)Thr-L-Cha-L-(Bzl)Thr-L-(Bzl)Ser-L-(PMB)Cys-



N-(BOC)-L-Ala-Gly-L-(PMB)Cys-L-(CbzOC)-Lys-L-Asn-L-Phe-L-Phe-L-Trp-L-(CbzOC)-Lys-L-(Bzl)Thr-L-Leu-L-(Bzl)Thr-L-(Bzl)-Ser-L-(PMB)Cys-O-CH2-



In den vorstehend zur Definition der Zwischenprodukte angegebenen Formeln bedeutet R entweder ein alpha-Aminowasserstoffatom oder eine alpha-Aminoschutzgruppe. Die für R in Betracht kommenden alpha-Aminoschutzgruppen sind auf dem Peptidgebiet allgemein bekannt, viele davon sind in Kapitel 2 (Autor J.W. Barton) von Protective Groups in Organic Chemistry, J.F.W. McOmie, Editor, Plenum Press, New York, 1973, im einzelnen aufgeführt. Beispiele für solche Schutzgruppen sind: Benzylloxycarbonyl, p-Chlorbenzylloxycarbonyl, p-Brombenzylloxycarbonyl, o-Chlorbenzylloxycarbonyl, 2,6-Dichlorbenzylloxycarbonyl, 2,4-Dichlorbenzylloxycarbonyl, o-Brombenzylloxycarbonyl, p-Methoxybenzylloxycarbonyl, p-Nitrobenzylloxycarbonyl, tert.-Butylloxycarbonyl (BOC), tert.-Amyloxycarbonyl, 2-(p-Biphenyl)-isopropylloxycarbonyl (BpOC), Adamantylloxycarbonyl, Isopropylloxycarbonyl, Cyclopentylloxycarbonyl, Cyclohexylloxycarbonyl, Cycloheptyloxycarbonyl, Triphenylmethyl (Trityl) und p-Toluolsulfonyl. Die bevorzugte alpha-Aminoschutzgruppe ist tert.-Butylloxycarbonyl.

R₁ bedeutet entweder den Wasserstoff der Sulfhydrylgruppe des Cysteins oder eine Schutzgruppe für den Sulfhydrylsubstituenten. Beispiele für geeignete derartige Schutzgruppen sind p-Methoxybenzyl, Benzyl, p-Tolyl, Benzhydryl, Acetamidomethyl, Trityl, p-Nitrobenzyl, tert.-Butyl, Isobutylmethyl und die verschiedenen Tritylderivate. Bezüglich weiterer Gruppen wird beispielsweise auf Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie, «Synthese von Peptiden», Bd. 15/1 und 15/2 (1974), Stuttgart, verwiesen. Die bevorzugte Sulfhydrylschutzgruppe ist p-Methoxybenzyl.

R₂ bedeutet Wasserstoff an der epsilon-Aminofunktion des Lysinrestes oder eine geeignete epsilon-Aminoschutzgruppe. Beispiele für solche Schutzgruppen sind die oben in Verbindung mit der alpha-Aminoschutzgruppe aufgeführten. Hierfür typische Gruppen dieser Art sind Benzylloxycarbonyl, tert.-Butylloxycarbonyl, tert.-Amyloxycarbonyl, Cyclopentylloxycarbonyl, Adamantylloxycarbonyl, p-Methoxybenzylloxycarbonyl, p-Chlorbenzylloxycarbonyl, p-Brombenzylloxycarbonyl, o-Chlorbenzylloxycarbonyl, 2,6-Dichlorbenzylloxycarbonyl, 2,4-Dichlorbenzylloxycarbonyl, o-Brombenzylloxycarbonyl, p-Nitrobenzylloxycarbonyl,

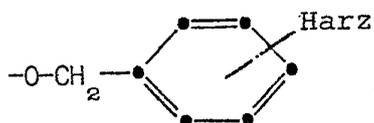
Isopropylloxycarbonyl, Cyclohexylloxycarbonyl, Cycloheptyloxycarbonyl und p-Toluolsulfonyl.

Wie im folgenden noch eingehender dargelegt, erfolgt bei dem erfindungsgemässen Verfahren zur Herstellung der Tetradecapeptide der Formel I periodische Abspaltung der alpha-Aminoschutzgruppe von der endständigen Aminosäure der Peptidkette. Die einzige Bedingung, die deshalb die epsilon-Aminoschutzgruppe an dem Lysinrest zu erfüllen hat, ist die, dass sie von solcher Art sein muss, dass sie unter den Bedingungen, die zur selektiven Abspaltung der alpha-Aminoschutzgruppe angewandt werden, nicht abgespalten wird. Die entsprechende Wahl der alpha-Amino- und der epsilon-Aminoschutzgruppen liegt im Rahmen des durchschnittlichen Wissens und Könnens eines Peptidchemikers und hängt im allgemeinen von den Unterschieden im Grad der Abspaltbarkeit der einzelnen Schutzgruppen ab. So sind Gruppen, wie 2-(p-Biphenyl)-isopropylloxycarbonyl (BpOC) und Trityl sehr labil und können schon in Gegenwart einer schwachen Säure abgespalten werden. Zur Abspaltung anderer Gruppen, wie tert.-Butylloxycarbonyl, tert.-Amyloxycarbonyl, Adamantylloxycarbonyl und p-Methoxybenzylloxycarbonyl ist gewöhnlich eine mässig starke Säure, wie Chlorwasserstoffsäure, Trifluoressigsäure oder Bortrifluorid in Essigsäure erforderlich. Noch stärker saure Bedingungen sind im allgemeinen nötig, um andere Schutzgruppen, wie Benzylloxycarbonyl, Halogenbenzylloxycarbonyl, p-Nitrobenzylloxycarbonyl, Cycloalkylloxycarbonyl und Isopropylloxycarbonyl, abzuspalten. Die Abspaltung der letztgenannten Gruppen erfordert normalerweise drastisch saure Bedingungen, zum Beispiel die Verwendung von Bromwasserstoffsäure, Fluorwasserstoffsäure oder Bortrifluoracetat in Trifluoressigsäure. Unter den stärker sauren Bedingungen werden selbstverständlich auch beispielsweise die labileren Gruppen abgespalten. Bei der Wahl der einzelnen Aminoschutzgruppen muss daher beispielsweise berücksichtigt werden, dass die Schutzgruppen an der alpha-Aminofunktion in Verbindung mit den Spaltungsbedingungen, die zur selektiven Entfernung allein der Schutzgruppe an der alpha-Aminofunktion angewandt werden, labiler ist als die epsilon-Aminoschutzgruppe. Deshalb ist R₂ vorzugsweise Cyclopentylloxycarbonyl, und in Verbindung damit ist die alpha-Aminoschutzgruppe der Wahl zur Verwendung für die einzelnen Aminosäuren, die an die Peptidkette angefügt werden, vorzugsweise tert.-Butylloxycarbonyl.

Die Gruppen R₃ und R₄ bedeuten Wasserstoff oder Schutzgruppen für die alkoholische Hydroxylgruppe von Threonin und Serin. Einzelne Beispiele für solche Schutzgruppen sind C₁-C₄-Alkyl, wie Methyl, Äthyl und tert.-Butyl, Benzyl, substituiertes Benzyl, wie p-Methoxybenzyl, p-Nitrobenzyl, p-Chlorbenzyl und o-Chlorbenzyl, C₁-C₃-Alkanoyl, wie Formyl, Acetyl und Propionyl sowie Triphenylmethyl (Trityl). Wenn R₃ und R₄ Schutzgruppen sind, dann ist die Schutzgruppe der Wahl in beiden Fällen Benzyl.

Die Gruppe R₅ bedeutet Wasserstoff oder eine Formylgruppe, die eine Schutzgruppe für die NH-Gruppe des Tryptophanrestes darstellt. Die Verwendung einer solchen Schutzgruppe bleibt dem Belieben überlassen, weshalb R₅ genau so gut Wasserstoff (N-ungeschützt) wie die Formylgruppe (N-geschützt) sein kann.

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



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

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

Ala	– Alanin
ASn	– Asparagin
Cha	– Cyclohexylalanin
Cys	– Cystein
Gly	– Glycin
Lys	– Lysin
Phe	– Phenylalanin
Ser	– Serin
Thr	– Threonin
Trp	– Tryptophan
DCC	– N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
DMF	– N,N-Dimethylformamid
BOC	– tert.-Butyloxycarbonyl
PMB	– p-Methoxybenzyl
CBzOC	– O-Chlorbenzyloxycarbonyl
CPOC	– Cyclopentylloxycarbonyl
Bzl	– Benzyl
For	– Formyl
BpOC	– 2-(p-Biphenyl)-isopropylloxycarbonyl

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

Wie aus dem bereits Gesagten klargeworden sein dürfte, kann das Tetradecapeptid der Formel I durch Festphasensynthese hergestellt werden. Diese Synthese besteht vorzugsweise aus einem stufenweisen Aufbau der Peptidkette, der am C-Ende der Peptidkette beginnt. Zunächst wird zweckmässig Cystein durch Umsetzung von aminogeschütztem S-geschütztem Cystein mit einem chlormethylierten Harz oder einem hydroxymethylierten Harz mit seiner Carboxylfunktion mit dem Harz verknüpft. Die Herstellung eines Hydroxymethylharzes ist beispielsweise von Bodansky et al., Chem. Ind. (London), Bd. 38, S. 1597–98 (1966) beschrieben. Das chlormethylierte Harz ist gewöhnlich im Handel erhältlich (Lab Systems, Inc., San Mateo, California, V.St.A.).

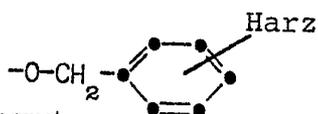
Zum Verknüpfen des C-Endes des Cysteins mit dem Harz wird das geschützte Cystein normalerweise zunächst in sein Cäsiumsalz übergeführt. Dieses Salz wird dann vorzugsweise nach der Methode von B. F. Gisin, Helv. Chim. Acta, Bd. 56, S. 1476 (1973) mit dem Harz umgesetzt. Das Cystein kann aber auch durch Aktivierung seiner Carboxylfunktion nach bekannten Arbeitsweisen mit dem Harz verknüpft werden. Beispielsweise kann man das Cystein in Gegenwart einer die Carboxylgruppe aktivierenden Verbindung, wie N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) mit dem Harz umsetzen.

Nach dem Verbinden der freien Carboxylgruppe des Cysteins mit dem Harzträger besteht normalerweise der übrige Anteil des Aufbaus des Peptids in stufenweisem Anbau jeder Aminosäure an das N-Ende der Peptidkette. Diese Anfügung einer Aminosäure erfordert im allgemeinen eine Abspaltung der alpha-Aminoschutzgruppe von der Aminosäure, die den N-Endteil des Peptidfragments darstellt, und danach das Anknüpfen des nächstfolgenden Aminosäurerests an das nun freie und reaktionsfähige N-Endteil. Die Abspaltung der alpha-Aminoschutzgruppe erfolgt zweckmässig in Gegenwart einer Säure, wie Bromwasserstoffsäure, Chlorwasserstoffsäure, Trifluoressigsäure, p-Toluolsulfonsäure, Benzolsulfonsäure, Naphthalinsulfonsäure oder Essigsäure unter Bildung des entsprechenden Säureadditionssalzes. Bei einer anderen bekannten Methode zur Abspaltung der Aminoschutzgruppe wird beispielsweise Bortrifluorid verwendet. Beispielsweise wird durch Bortrifluoriddiäthylätherat in Eisessig das aminogeschützte Peptidfragment in einen BF_3 -Komplex übergeführt, der dann durch Behandlung mit einer Base, wie wässrigem Kaliumbicarbonat, in das entblockierte Peptidfragment umgewandelt werden kann. Jede dieser Methoden kann angewandt werden, solange man darauf achtet, dass so gearbeitet werden muss, dass die Abspaltung der endständigen alpha-Aminoschutzgruppe ohne Einfluss auf die anderen an der Peptidkette vorliegenden Schutzgruppen bleibt. Zu diesem Zwecke ist es bevorzugt, die Abspaltung der Schutzgruppe am N-Ende mittels Trifluoressigsäure zu bewirken. Im allgemeinen wird die Abspaltung bei einer Temperatur von etwa $0^\circ C$ bis Zimmertemperatur durchgeführt.

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

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

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



bedeutet, bevorzugt.

Wenn dann die gewünschte Aminosäuresequenz vorliegt, kann das Peptid von dem Harzträger entfernt werden. Hierzu wird das geschützte Harzträger-Tetradecapeptid gewöhnlich mit Fluorwasserstoff behandelt. Dadurch wird normalerweise das Peptid von dem Harz abgespalten. Ausserdem werden dadurch im allgemeinen jedoch alle noch vorhandenen Schutzgruppen an den reaktionsfähigen Stellen der Peptidkette sowie die alpha-Aminoschutzgruppe abgespalten, die an der Aminosäure am N-Ende vorliegt. Bei Verwendung von Fluorwasserstoff zur Abspaltung des Peptids von dem Harz sowie zur Entfernung der Schutzgruppen ist es bevorzugt, die Reaktion in Gegenwart von Anisol durchzuführen. Es hat sich beispielsweise gezeigt, dass die Gegenwart von Anisol die mögliche Alkylierung bestimmter, in der Peptidkette vorliegender Aminosäurereste inhibiert. Ausserdem ist es bevorzugt, die Spaltung in Gegenwart von Äthylmercaptan durchzuführen. Das Äthylmercaptan dient vorzugsweise zum Schutz des Indolrings des Tryptophanrestes und erleichtert ausserdem die Überführung der blockierten Cysteinreste in ihre Thiolformen. Falls R₅ eine Formylgruppe ist, fördert die Gegenwart von Äthylmercaptan ausserdem normalerweise die Abspaltung der Formylgruppe durch Fluorwasserstoff.

Das nach der Abspaltungsreaktion erhaltene Produkt ist im allgemeinen ein geradkettiges Peptid mit 14 Aminosäureresten. Zur Erzielung des Endprodukts der Formel I muss das geradkettige Tetradecapeptid Bedingungen unterworfen werden, die zu seiner Oxydation führen, indem die beiden im Molekül vorliegenden Sulfhydrylgruppen, je eine an den Cysteinylanteilen, in eine Disulfidbrücke übergeführt werden. Dies kann durch Behandeln einer verdünnten Lösung des linearen Tetradecapeptids mit einem Oxydationsmittel, zum Beispiel Jod oder Kaliumferricyanid, erreicht werden. Der pH-Wert der Mischung liegt dabei im allgemeinen zwischen etwa 2,5 und 9,0, vorzugsweise zwischen etwa 7,0 und 7,6. Wenn Luft als Oxydationsmittel verwendet wird, ist die Konzentration der Lösung im allgemeinen nicht höher als etwa 0,4 mg Peptid/ml Lösung und liegt vorzugsweise bei etwa 50 µg/ml.

Die Verbindungen der Formel I können an warmblütige Säugetiere einschliesslich Menschen in beliebiger Weise verabreicht werden, zum Beispiel oral, sublingual, subkutan, intramuskulär und intravenös. Die Verabreichung dieser Verbindungen inhibiert im allgemeinen die Freisetzung von Wachstumshormon. Diese inhibitorische Wirkung ist beispielsweise in den Fällen von Vorteil, in denen das behandelte Lebewesen wegen einer übermässigen Sekretion von Somatotropin einer therapeutischen Behandlung bedarf; eine derartige Sekretion ist mit krankhaften Zuständen, zum Beispiel juvenilem Diabetes und Acromegalie, verbunden. L-

Leu¹¹-Somatostatin zeigt beispielsweise auch eine inhibierende Wirkung auf die Pankreassekretion von Insulin. Der Dosierungsbereich für die sublinguale oder orale Verabreichung liegt vorzugsweise bei etwa 1 bis 100 mg/kg Körpergewicht und Tag. Bei intravenöser, subkutaner oder intramuskulärer Verabreichung liegen die Dosen im allgemeinen zwischen etwa 10 µg und 1 mg/kg Körpergewicht und Tag und vorzugsweise zwischen etwa 50 und 100 µg/kg Körpergewicht und Tag. Es ist selbstverständlich, dass die Dosierung im allgemeinen innerhalb eines weiten Bereichs schwankt, weil sie sich nach dem jeweils zu behandelnden Zustand und seinem Schweregrad richtet.

Die Verbindungen der Formel I können auch in der Form von Tabletten, die andere unschädliche Bestandteile enthalten, verabreicht werden. Inerte Verdünnungsmittel oder Träger, zum Beispiel Magnesiumcarbonat oder Lactose, können zusammen mit herkömmlichen Zerfallsmitteln, zum Beispiel Maisstärke und Alginsäure, und Gleitmitteln, wie Magnesiumstearat, verwendet werden. Die Menge des Trägers oder Verdünnungsmittels kann etwa 5 bis 95%, vorzugsweise etwa 50 bis 85%, des fertigen Präparats ausmachen. Auch Aromastoffe können verwendet werden, die das fertige Präparat für die Verabreichung geschmacklich verbessern.

Für die intravenöse Verabreichung der Verbindungen der Formel I können hierfür geeignete Träger verwendet werden, zum Beispiel isotone Kochsalzlösung oder Phosphatpufferlösung.

Die Erfindung kann durch die folgenden Beispiele weiter erläutert werden:

Beispiel 1

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-cysteinyl-(S-p-Methoxybenzyl)-methyliertes Polystyrolharz

Zu einer Suspension von 51,0 g chlormethyliertem Polystyrolharz (Lab Systems, Inc., 0,75 mMol/g) in 500 ml N,N-Dimethylformamid (DMF) werden 11,95 g (25,25 mMol) des Cäsiumsalzes von N-tert.-Butyloxycarbonyl-(S-p-methoxybenzyl)cystein gegeben. Die Mischung wird 5 Tage bei Zimmertemperatur gerührt. Das Harz wird abfiltriert und nacheinander zweimal mit DMF, dreimal mit einer Mischung aus DMF und 10% Wasser, dreimal mit 95prozentigem Äthanol und dreimal mit DMF gewaschen. Eine Suspension des Harzes in 500 ml DMF wird in eine Lösung von 10,5 g Cäsiumacetat gegeben, und die Mischung wird 7 Tage bei Zimmertemperatur gerührt. Dann wird das Harz abfiltriert und nacheinander zweimal mit DMF, dreimal mit einer Mischung aus 90% DMF und 10% Wasser, dreimal mit 95prozentigem Äthanol, dreimal mit Methylenchlorid und dreimal mit 95prozentigem Äthanol gewaschen. Anschliessend wird das Harz im Vakuum bei 40 °C getrocknet, wodurch das in der Überschrift angegebene Produkt erhalten wird. Eine Aminosäureanalyse ergibt 0,258 mMol Cys/g Harz. Das Cystein wird als Cysteinsäure bestimmt, die bei einer Säurehydrolyse unter Verwendung einer Mischung von gleichen Teilen Dioxan und konzentrierter Salzsäure mit einem kleinen Zusatz von Dimethylsulfoxid gebildet wird.

Beispiel 2

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanyl-glycyl-L-(S-p-methoxybenzyl)-cysteinyl-L-(N^{epsilon}-o-chlorbenzyl-oxy-carbonyl)-lysyl-L-asparaginyll-L-phenylalanyl-L-phenylalanyl-L-tryptophyl-L-(N^{epsilon}-o-chlorbenzyloxycarbonyl)-lysyl-L-(O-benzyl)-threonyl-D-phenylalanyl-L-(O-benzyl)-threonyl-L-(O-benzyl)-seryl-L-(S-p-methoxybenzyl)-cysteinyl-methyliertes Polystyrolharz

5,0 g des nach Beispiel 1 erhaltenen Produkts werden in das Reaktionsgefäss eines automatischen Peptidsynthetisier-

geräts (Beckman 990) eingebracht, und die übrigen 13 Aminosäuren werden unter Verwendung dieses Geräts angefügt. Die verwendeten Aminosäuren und die Reihenfolge ihrer Anwendung sind wie folgt:

- (1) N-tert.-Butyloxycarbonyl-(O-benzyl)-L-serin,
- (2) N-tert.-Butyloxycarbonyl-(O-benzyl)-L-threonin,
- (3) N-tert.-Butyloxycarbonyl-D-phenylalanin,
- (4) N-tert.-Butyloxycarbonyl-(O-benzyl)-L-threonin,
- (5) N^{alpha}-tert.-Butyloxycarbonyl-N^{epsilon}-o-chlorbenzyloxycarbonyl-L-lysin,
- (6) N^{alpha}-tert.-Butyloxycarbonyl-L-tryptophan,
- (7) N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-phenylalanin,
- (8) N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-phenylalanin,
- (9) N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-asparagin-p-nitrophenylester,
- (10) N^{alpha}-tert.-Butyloxycarbonyl-N^{epsilon}-o-chlorbenzyloxycarbonyl-L-lysin,
- (11) N-tert.-Butyloxycarbonyl-(S-p-methoxybenzyl)-L-cystein,
- (12) N-tert.-Butyloxycarbonyl-glycin und
- (13) N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanin.

Schutzgruppenentfernung, Neutralisation, Anlagerung und erneute Anlagerung zur Einfügung jeder einzelnen Aminosäure in das Peptid wird folgendermassen durchgeführt:

- (1) drei Wäschen von je 3 Minuten mit Chloroform (10 ml/g Harz), (2) Entfernung der BOC-Gruppe durch zweimaliges Behandeln von je 20 Minuten mit 10 ml/g Harz einer Mischung aus 28,8% Trifluoressigsäure, 65,4% Chloroform und 5,8% Triäthylsilan, (3) zwei Wäschen von je 3 Minuten mit Chloroform (10 ml/g Harz), (4) eine Wäsche von 3 Minuten mit Methylenchlorid (10 ml/g Harz), (5) drei Wäschen von je 3 Minuten mit einer Mischung aus 90% tert.-Butylalkohol und 10% tert.-Amylalkohol (10 ml/g Harz), (6) drei Wäschen von je 3 Minuten mit Methylenchlorid (10 ml/g Harz), (7) Neutralisation durch drei Behandlungen von je 3 Minuten mit 10 ml/g Harz 3prozentigem Triäthylamin in Methylenchlorid, (8) drei Wäschen von je 3 Minuten mit Methylenchlorid (10 ml/g Harz), (9) drei Wäschen von je 3 Minuten mit einer Mischung aus 90% tert.-Butylalkohol und 10% tert.-Amylalkohol (10 ml/g Harz), (10) drei Wäschen von je 3 Minuten mit Methylenchlorid (10 ml/g Harz), (11) Zugabe von 1,0 mMol/g Harz der geschützten Aminosäure und 1,0 mMol/g Harz N,N-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) in 10 ml/g Harz Methylenchlorid und anschliessendes Mischen während 120 Minuten, (12) drei Wäschen von je 3 Minuten mit Methylenchlorid (10 ml/g Harz), (13) drei Wäschen von je 3 Minuten mit einer Mischung aus 90% tert.-Butylalkohol und 10% tert.-Amylalkohol (10 ml/g Harz), (14) drei Wäschen von je 3 Minuten mit Methylenchlorid (10 ml/g Harz), (15) Neutralisation durch drei Behandlungen von je 3 Minuten mit 10 ml/g Harz dreiprozentigem Triäthylamin in Methylenchlorid, (16) drei Wäschen von je 3 Minuten mit Methylenchlorid (10 ml/g Harz), (17) drei Wäschen von je 3 Minuten mit einer Mischung aus 90% tert.-Butylalkohol und 10% tert.-Amylalkohol (10 ml/g Harz), (18) drei Wäschen von je 3 Minuten mit Methylenchlorid (10 ml/g Harz), (19) drei Wäschen von je 3 Minuten mit DMF (10 ml/g Harz), (20) Zugabe von 1,0 mMol pro g Harz der geschützten Aminosäure und 1,0 mMol pro g Harz N,N-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) in 10 ml/g Harz einer Mischung aus gleichen Teilen DMF und Methylenchlorid und anschliessendes Mischen während 120 Minuten, (21) drei Wäschen von je 3 Minuten mit DMF (10 ml/g Harz), (22) drei Wäschen von je 3 Minuten mit Methylenchlorid (10 ml/g Harz), (23) drei Wäschen von je 3 Minuten mit einer Mischung aus 90% tert.-Butylalkohol und 10% tert.-Amylalkohol (10 ml/g Harz), (24) drei Wäschen von je 3 Minuten mit Methylenchlorid (10 ml/g Harz), (25) Neutralisation

durch drei Behandlungen von je 3 Minuten mit 10 ml/g Harz dreiprozentigem Triäthylamin in Methylenchlorid, (26) drei Wäschen von je 3 Minuten mit Methylenchlorid (10 ml/g Harz), (27) drei Wäschen von je 3 Minuten mit einer Mischung aus 90% tert.-Butylalkohol und 10% tert.-Amylalkohol (10 ml/g Harz) und (28) drei Wäschen von je 3 Minuten mit Methylenchlorid (10 ml/g Harz).

Mit Ausnahme des Asparaginrests wird jede Aminosäure durch die vorstehend beschriebene Folge von Massnahmen eingeführt. Der Asparaginrest wird über seinen aktiven p-Nitrophenylester eingeführt. Dabei wird die Stufe 11 folgendermassen modifiziert: (a) drei Wäschen von je 3 Minuten mit DMF (10 ml/g Harz), (b) Zugabe von 1,0 mMol/g Harz des p-Nitrophenylesters von N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-asparagin in 10 ml/g Harz einer 1 : 3-Mischung von DMF mit Methylenchlorid und anschliessendes Mischen während 720 Minuten und (c) drei Wäschen von je 3 Minuten mit DMF (10 ml/g Harz). Die Stufe (20) wird in der Weise abgeändert, dass eine 3 : 1-Mischung von DMF mit Methylenchlorid anstelle der 1 : 1-Mischung verwendet wird.

Das fertige Peptid-Harz-Produkt wird im Vakuum getrocknet. Ein Teil des Produkts wird durch Erwärmen mit einer Mischung aus Salzsäure und Dioxan zum Sieden unter Rückfluss während 21 Stunden hydrolysiert. Die Aminosäureanalyse des Produkts unter Verwendung von Lysin als Standard ergibt folgende Werte: Asn 1,12, 2Thr 2,16, Ser 1,08, Gly 1,08, Ala 1,14, 3Phe 3,18, 2Lys 2,00, Trp 0,60. Tryptophan wird durch Hydrolyse in Gegenwart von Thio-glykolsäure ermittelt. Cystein wird nicht bestimmt, da es durch die Analysenmethode zerstört wird.

Beispiel 3

L-Alanyl-glycyl-L-cysteinyl-L-lysyl-L-asparaginyll-L-phenylalanyl-L-phenyl-alanyl-L-tryptophyl-L-lysyl-L-threonyl-D-phenylalanyl-L-threonyl-L-seryl-L-cystein

Zu einer Mischung aus 10 ml Anisol und 10 ml Äthylmercaptan werden 2,708 g (bei einem Substitutionswert von 0,155 mMol/g) des geschützten Tetradecapeptidharzes von Beispiel 2 gegeben. Nach Köhlen der Mischung in flüssigem Stickstoff werden 44 ml flüssiger Fluorwasserstoff durch Destillation eingeführt. Man lässt die gebildete Mischung sich auf 0°C erwärmen und rührt 1,5 Stunden. Dann wird der Fluorwasserstoff abdestilliert und Äther zu der hinterbleibenden Mischung gegeben. Die gebildete Festsubstanz wird abfiltriert und mit Äther gewaschen. Das Produkt wird getrocknet, und das von Schutzgruppen befreite Tetradecapeptid wird unter Verwendung von entgaster 1n Essigsäure und einer kleinen Menge Eisessig von dem Harz extrahiert. Die Essigsäurelösung wird unmittelbar danach im Dunkeln zur Trockene lyophilisiert. Der gebildete schwachgelbe Feststoff wird in einer Mischung aus 12 ml entgaster 0,2 m Essigsäure und 4 ml Eisessig suspendiert. Diese Suspension wird filtriert, und das Filtrat wird an einer Sephadex G-25 F-Säule absorbiert.

Bedingungen der Chromatographie:

Lösungsmittel, entgaste 0,2m Essigsäure,
Säulengrösse 7,5 × 150 cm,
Temperatur 26°C,
Fliessgeschwindigkeit 668 ml/Stunde,
Fraktionsvolumen 23,4 ml.

Durch Auftragen der Absorption bei 280 mμ jeder Fraktion gegen die Nummer der Fraktion erhält man eine grosse Spitze mit einer Schulter auf beiden Seite. Es werden drei Fraktionsvereinigungen vorgenommen. Die Fraktionen, die vereinigt werden, und ihre Austrittsvolumina sind wie folgt:

Fractionen 115–213 (2668–4984 ml)
 Fractionen 214–230 (4985–5382 ml)
 Fractionen 231–320 (5383–7488 ml)

Die UV-Spektroskopie zeigt, dass die zweite Fraktion das beste Produkt enthält und dass darin 123,7 mg Produkt enthalten sind. Eine Ellman-Titration ergibt einen Gehalt an freiem Sulfhydryl von 63% der Theorie.

Beispiel 4

Oxydation zu D-Phe¹¹-Somatostatin

Eine Lösung des nach Beispiel 3 erhaltenen reduzierten D-Phe¹¹-Somatostatins wird mit 0,2m Essigsäure und destilliertem Wasser auf eine Konzentration von 50 µg/ml verdünnt. Zur Einstellung des pH-Werts der Mischung auf 6,9 wird konzentriertes Ammoniumhydroxid zugegeben. Die Lösung wird 90 Stunden bei Zimmertemperatur gerührt, und eine danach durchgeführte Ellman-Titration zeigt die Vollständigkeit der Oxydation an.

Die Mischung wird im Vakuum bis zu einer viskosen Suspension eingeengt. Diese Suspension wird in 14 ml 50prozentiger Essigsäure gelöst und dann in 50prozentiger Essigsäure an einer Sephadex G-25 F-Säule entsalzt.

Bedingungen der Chromatographie:

Lösungsmittel, entgaste 50prozentige Essigsäure,
 Säulengröße 5,0 × 90 cm,
 Temperatur 26 °C,
 Fliessgeschwindigkeit 298 ml/Stunde,
 Fraktionsvolumen 17,4 ml.

Durch Auftragen der Absorption bei 280 mµ jeder Fraktion gegen die Nummer der Fraktion erhält man zwei grosse Spitzen. Die erste Spitze entspricht den aggregierten Formen des Produkts, und die zweite Spitze dem monomeren Produkt. Das Material der zweiten Spitze wird gesammelt und zur Trockne lyophilisiert. Der erhaltene weisse Feststoff wird in 6 ml entgaster 0,2m Essigsäure gelöst und an einer Sephadex G-25 F-Säule absorbiert.

Bedingungen der Chromatographie:

Lösungsmittel, entgaste 0,2m Essigsäure,
 Säulengröße 5,0 × 150 cm,
 Temperatur 26 °C,
 Fliessgeschwindigkeit 483 ml/Stunde
 Fraktionsvolumen 16,1 ml

Durch Auftragen der Absorption bei 280 mµ jeder Fraktion gegen die Nummer der Fraktion erhält man eine Produktpitze mit abfallenden Schultern. Die UV-Spektroskopie zeigt, dass der Hauptteil der Spitze gutes Produkt darstellt. Die Fraktionen 165 bis 182 (Austrittsvolumen von 2640 bis 2930 ml) werden vereinigt und zur Trockne lyophilisiert und ergeben 56,2 mg des gewünschten Produkts.

Optische Drehung $[\alpha]_D^{26} = -40,7^\circ$ (1%, Essigsäure).

Aminosäureanalyse: Ala 1,0, Gly 1,02, 2Cys 1,95, 2Lys 1,97, Asn 1,05, 2Phe + D-Phe 2,84, Trp 0,85, 2Thr 1,86, Ser 0,80.

Diese Ergebnisse sind ausgedrückt als Verhältnisse zur Hälfte der Summe von Glycin und Alanin. Cystein wird als Cysteinsäure nach Hydrolyse in Gegenwart von Dimethylsulfoxid bestimmt. Tryptophan wird nach Hydrolyse in Gegenwart von Thioglykolsäure bestimmt. Bei Serin sind die während der Hydrolyse eingetretenen Verluste nicht berücksichtigt.

Beispiel 5

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanyl-glycyl-L-(S-p-methoxybenzyl)-cysteinyl-L-(N^{epsilon}-o-chlorbenzyl-oxy-carbonyl)-lysyl-L-asparaginyll-L-phenylalanyl-L-phenylalanyl-L-(formyl)-tryptophyl-L-(N^{epsilon}-o-chlor-benzyl-oxy-carbonyl)-lysyl-L-(O-benzyl)-threonyl-L-cyclohexylalanyl-L-(O-benzyl)-threonyl-L-(O-benzyl)-seryl-L-(S-p-methoxybenzyl)-cysteinyl-methyliertes Polystyrolharz

Diese Verbindung wird nach einem dem in Beispiel 2 beschriebenen Verfahren ähnlichen unter Verwendung von 3,5 g des nach Beispiel 1 erhaltenen Produkts als Ausgangsmaterial hergestellt. Das automatische Peptidsynthesiergerät (Beckman 990) wird für die gesamte Stufenfolge verwendet. N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-cyclohexylalanin wird anstelle von N-tert.-Butyloxycarbonyl-D-phenylalanin und N^{epsilon}-tert.-Butyloxycarbonyl-(N-formyl)-L-tryptophan anstelle von N^{epsilon}-tert.-Butyloxycarbonyl-L-tryptophan verwendet.

Die bei der Folge von Schutzgruppenentfernung, Neutralisation, Anlagerung und erneuter Anlagerung zur Einführung jeder einzelnen Aminosäure in das Peptid angewandten Bedingungen sind mit den in Beispiel 2 angegebenen identisch. Lediglich in der Abspaltungsreaktion von Stufe (2) wird eine Mischung aus 28,8% Trifluoressigsäure, 47,9% Chloroform, 5,8% Triäthylsilan und 17,5% Methylchlorid verwendet.

Die Aminosäureanalyse des erhaltenen Produkts ergibt unter Verwendung von Lysin als Standard folgende Werte: Asn 1,18, 2Thr 2,50, Ser 1,28, Gly 1,33, Ala 1,38, 2Phe 2,16, 2Lys 2,00, Cha 1,21, Trp 0,85. Cystein wird nicht bestimmt, weil es durch die Analysenmethode zerstört wird.

Beispiel 6

L-Alanyl-glycyl-L-cysteinyl-L-lysyl-L-asparaginyll-L-phenylalanyl-L-phenylalanyl-L-tryptophyl-L-lysyl-L-threonyl-L-cyclohexylalanyl-L-threonyl-L-seryl-L-cystein

Diese Verbindung wird nach der in Beispiel 3 beschriebenen Arbeitsweise unter Verwendung von 2,851 g (bei einem Substitutionswert von 0,148 mMol/g) des nach Beispiel 5 erhaltenen Produkts hergestellt. Die Reinigung des Produkts erfolgt durch Chromatographie in einer Sephadex G-25 F-Säule.

Bedingungen durch Chromatographie:

Lösungsmittel, entgaste 0,2m Essigsäure,
 Säulengröße 7,5 × 150 cm,
 Temperatur 26 °C,
 Fliessgeschwindigkeit 650 ml/Stunde,
 Fraktionsvolumen 22,75 ml.

Durch Auftragen der Absorption bei 280 mµ jeder Fraktion gegen die Nummer der Fraktion erhält man eine grosse Spitze mit hinterherziehenden Verunreinigungen. Zwei Sätze von Fraktionen werden vereinigt, die vereinigten Fraktionen und ihre Austrittsvolumina sind folgende:

Fraktionen 195–209 (4413–4755 ml)
 Fraktionen 210–227 (4756–5164 ml).

Die UV-Spektroskopie ergibt, dass die zweite Probe, die die theoretische Menge von 305,4 mg anzeigt, das bessere Produkt ist. Eine Ellman-Titration ergibt einen Gehalt an freiem Sulfhydryl von 96% der Theorie.

Beispiel 7

Oxydation zu L-Cha¹¹-somatostatin

Das nach Beispiel 6 erhaltene reduzierte L-Cha¹¹-somatostatin wird wie in Beispiel 4 beschrieben behandelt. Das Produkt wird an einer Sephadex G-25 F-Säule adsorbiert.

Bedingungen der Chromatographie:
Lösungsmittel, entgaste 50prozentige Essigsäure,
Säulengröße 5,0 × 90 cm,
Temperatur 26 °C,
Fließgeschwindigkeit 276 ml/Stunde,
Fraktionsvolumen 16,1 ml.

Durch Auftrag der Absorption bei 280 m μ jeder einzelnen Fraktion gegen die Nummer der Fraktion erhält man zwei grosse Spitzen. Die erste Spitze stellt aggregierte Formen des Produkts und die zweite Spitze gutes monomeres Produkt dar. Das Produkt der zweiten Spitze wird gesammelt und zur Trockne lyophilisiert. Die erhaltene weisse feste Substanz wird in 15 ml entgaster 0,2m Essigsäure gelöst, und die Lösung wird auf eine Sephadex G-25 F-Säule aufgebracht.

Bedingungen der Chromatographie:
Lösungsmittel, entgaste 0,2m Essigsäure,
Säulengröße 5,0 × 150 cm,
Temperatur 26 °C,
Fließgeschwindigkeit 486 ml/Stunde,
Fraktionsvolumen 17 ml.

Durch Auftragen der Absorption bei 280 m μ jeder Fraktion gegen die Nummer der Fraktion, erhält man eine grosse Spitze. Die UV-Spektroskopie ergibt, dass diese grosse Spitze gutem Produkt entspricht. Die Fraktionen 151 bis 162 (Austrittsvolumen von 2550 bis 2754 ml) werden vereinigt und im Dunkeln zur Trockne lyophilisiert, wodurch 136,7 mg des gewünschten Produkts erhalten werden. Optische Drehung $[\alpha]_D^{26} = -44,7^\circ$ (1%, Essigsäure).

Aminosäureanalyse: Ala 1,01, Gly 0,99, 2Cys 2,10, 2Lys 1,96, Asn 1,02, 2Phe 1,73, Trp 0,91, 2Thr 1,94, Cha 1,07, Ser 0,77.

Diese Ergebnisse sind als Verhältnisse zur Hälfte der Summe von Glycin und Alanin ausgedrückt. Cystein wird als Cysteinsäure nach Hydrolyse in Gegenwart von Dimethylsulfoxid bestimmt. Tryptophan wird nach Hydrolyse in Gegenwart von Thioglycolsäure bestimmt. Bei Serin sind die während der Hydrolyse eingetretenen Verluste nicht berücksichtigt.

Beispiel 8

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanyl-glycyl-L-(S-p-methoxybenzyl)-cysteinyl-L-(N^{epsilon}-o-chlorbenzyloxycarbonyl)-lysyl-L-asparaginyll-L-phenylalanyl-L-phenylalanyl-L-tryptophyll-L-(N^{epsilon}-o-chlorbenzyloxycarbonyl)-lysyl-L-(O-benzyl)-threonyll-L-leucyll-L-(O-benzyl)-threonyll-L-(O-benzyl)-seryll-L-(S-p-methoxybenzyl)-cysteinyl-methyliertes Polystyrolharz

Dieses Produkt wird wie in Beispiel 2 beschrieben, unter Verwendung von 3,5 g des nach Beispiel 1 erhaltenen Produkts als Ausgangsmaterial hergestellt. Für die gesamte Stufenfolge wird ein automatisches Peptidsynthetisiergerät (Beckman 990) verwendet. N-tert.-Butyloxycarbonyl-D-phenylalanin verwendet. Die bei der Folge von Schutzgruppenentfernung, Neutralisation, Anlagerung und erneute Anlagerung zur Einführung jeder einzelnen Aminosäure in das Peptid angewandten Bedingungen entsprechen den in Beispiel 2 angegebenen. Lediglich bei der Abspaltungsreaktion von Stufe (2) wird eine Mischung aus 28,8% Trifluoressigsäure, 47,9% Chloroform, 5,8% Triäthylsilan und 17,5% Methylchlorid verwendet.

Die Aminosäureanalyse des erhaltenen Produkts ergibt unter Verwendung von Lysin als Standard folgende Werte: Ala 1,41, Gly 1,26, 2Lys 2,0, Asn 1,20, 2Phe 2,16, Trp 0,82, 2Thr 2,38, Leu 1,15, Ser 1,18. Cystein wird nicht bestimmt, weil es durch die Analysenmethode zerstört wird.

Beispiel 9

L-Alanyl-glycyl-L-cysteinyl-L-lysyl-L-asparaginyll-L-phenylalanyl-L-phenylalanyl-L-tryptophyll-L-lysyl-L-threonyll-L-leucyll-L-threonyll-L-seryll-L-cystein

Diese Verbindung wird nach der in Beispiel 3 beschriebenen Arbeitsweise unter Verwendung von 2,875 g (bei einem Substitutionswert von 0,152 mMol/g Harz) des nach Beispiel 8 erhaltenen Produkts hergestellt. Das Produkt wird durch Chromatographieren an einer Sephadex G-25 F-Säule gereinigt.

Bedingungen der Chromatographie:
Lösungsmittel, entgaste 0,2m Essigsäure,
Säulengröße 7,5 × 150 cm,
Temperatur 26 °C,
Fließgeschwindigkeit 666 ml/Stunde,
Fraktionsvolumen 23,3 ml.

Durch Auftragen der Absorption bei 280 m μ jeder einzelnen Fraktion gegen die Nummer der Fraktion wird eine sehr grosse Spitze mit niedrigen, breiten, führenden und schlep-penden Schultern erhalten. Drei Sätze von Fraktionen werden vereinigt. Die vereinigten Fraktionen und ihre Austrittsvolumina sind folgende:

Fraktionen 180–196 (4163–4560 ml)

Fraktionen 197–215 (4561–5003 ml)

Fraktionen 216–275 (5004–6405 ml).

Die UV-Spektroskopie zeigt, dass die zweite Probe mit einer theoretischen Menge von 320 mg das beste Produkt darstellt. Eine Ellman-Titration ergibt einen Gehalt an freiem Sulfhydryl von 88,5% der Theorie.

Beispiel 10

Oxydation zu L-Leu¹¹-Somatostatin

Das nach Beispiel 9 erhaltene reduzierte L-Leu¹¹-Somatostatin wird der in Beispiel 4 beschriebenen Arbeitsweise unterworfen. Das Produkt wird an einer Sephadex G-25 F-Säule adsorbiert.

Bedingungen der Chromatographie:
Lösungsmittel, entgaste 50prozentige Essigsäure,
Säulengröße 5,0 × 90 cm,
Temperatur 26 °C,
Fließgeschwindigkeit 282 ml/Stunde,
Fraktionsvolumen 16,3 ml.

Durch Auftragen der Absorption bei 280 m μ jeder einzelnen Fraktion gegen die Nummer der Fraktion werden zwei grosse Spitzen erhalten. Die erste Spitze entspricht aggregierten Formen des Produkts, und die zweite Spitze entspricht gutem monomeren Produkt. Das der zweiten Spitze entsprechende Produkt wird gesammelt, mit dem entsprechenden Material aus einem anderen Herstellungsansatz vereinigt und zur Trockne lyophilisiert. Der Feststoff wird in 10 ml entgaster 0,2m Essigsäure gelöst, und die Lösung wird auf eine Sephadex G-25 F-Säule aufgebracht.

Bedingungen der Chromatographie:
Lösungsmittel, entgaste 0,2m Essigsäure,
Säulengröße 5,0 × 150 cm,
Temperatur 26 °C,
Fließgeschwindigkeit 498 ml/Stunde,
Fraktionsvolumen 17,5 ml.

Durch Auftragen der Absorption bei 280 m μ jeder einzelnen Fraktion gegen die Nummer der Fraktion wird eine grosse Spitze mit einer kleinen führenden Schulter erhalten. Die UV-Spektroskopie zeigt, dass die grosse Spitze gutem Produkt entspricht. Die Fraktionen 139 bis 153 (Austrittsvolumen von 2421 bis 2686 ml) werden vereinigt und im Dunkeln zur Trockne lyophilisiert, wodurch 130,8 mg des gewünschten Produkts erhalten werden.

Optische Drehung $[\alpha]_D^{26} = -28,1^\circ$ (1%, Essigsäure).

Aminosäureanalyse: Ala 1,03, Gly 0,97, 2Cys 1,83, 2Lys 1,96, Asn 0,94, 2Phe 1,95, Trp 0,89, 2Thr 1,83, Leu 0,95, Ser 0,83.

Die vorstehenden Ergebnisse sind als Verhältnisse zur Hälfte der Summe von Glycin und Alanin ausgedrückt. Cystein wird als Cysteinsäure nach Hydrolyse in Gegenwart von Dimethylsulfoxid und Tryptophan nach Hydrolyse in Gegenwart von Thioglykolsäure bestimmt. Bei Serin sind die während der Hydrolyse eingetretenen Verluste nicht berücksichtigt.

D-Phe¹¹-Somatostatin, L-Cha¹¹-Somatostatin und L-Leu¹¹-Somatostatin werden auf ihre Wirksamkeit der Inhibition der Magensäuresekretion geprüft. 12 bis 16 cm grosse Ochsenfrösche werden durch Zerschneiden des Rückenmarks getötet. Die Magenschleimhaut wird von den Muskelschichten befreit und der Länge nach in zwei Teile zerschnitten, die in voneinander getrennten Kammern aus Acrylkunststoff befestigt werden. Die ausgesetzte Sekretionsfläche beträgt 2,85 cm² und das Volumen jeder Hälfte der Kammer 5 ml. Die zum Befeuchten der Schleimhaut verwendeten Lösungen sind die gleichen wie die von Durbin et al., *Biochemica et Biophysica Acta*, Bd. 321, S. 553–560 (1973) verwendeten, mit der Ausnahme, dass die Serumflüssigkeit Natriumdihydrogenphosphat in einer Konzentration von 1 mMol enthält. Beide Seiten der Kammer werden mit einer Mischung aus 95% Sauerstoff und 5% Kohlendioxid belüftet. Unter Aufrechterhaltung eines pH-Werts der Sekretionslösung von 4,5 wird die Säuresekretionsgeschwindigkeit verfolgt.

Eine Konzentration von 1×10^{-5} Mol/Liter Pentagastrin auf der serösen Seite des Gewebes dient zur Stimulierung der Säuresekretionswirkung. Die seröse Flüssigkeit wird alle 40 Minuten erneuert, um eine Erniedrigung der Pentagastrinkonzentration durch enzymatische Hydrolyse der Peptidbindungen zu verhindern. Die Zugabe der zu prüfenden Verbindung erfolgt durch Einbringen in die seröse Flüssigkeit jedesmal, wenn die Benetzungslösung gewechselt wird.

Spontane Säureausscheidungen infolge der pentagastrin-stimulierten Sekretion, die zu einer Säurebildung von nicht weniger als 8 Mikroäquivalenten/Stunde führen, dienen als Kontrollen. Die Wirkung der Inhibition der Magensäuresekretion wird als Prozentsatz der Inhibition ausgedrückt, die auf die Kontrollzeiträume vor dem Einführen der zu prüfenden Verbindung in den serösen Puffer bezogen ist. Nur eine der Hälften der Magenschleimhaut wird mit der Testverbindung behandelt, während die andere Hälfte als Kontrolle dafür dient, dass das Gewebe dauernd lebend bleibt. Nach dem Einstellen einer gleichbleibenden Sekretion wird die Testverbindung der Nährlösung in einer Menge zugegeben, mit der eine Inhibitorenkonzentration von 1×10^{-5} Mol/Liter erreicht wird. Die Säure wird kontinuierlich auf pH 4,5 titriert, und das alle 20 Minuten eingesetzte Volumen von 12,5 mMol Natriumhydroxid dient zur Bestimmung der Säuresekretionsgeschwindigkeit. Die Ergebnisse sind als Mikroäquivalente sekretierter Säure pro Stunde ausgedrückt.

Unter Anwendung dieser Bewertungsmethode erzeugt Somatostatin selbst eine prozentuale Inhibition der Magensäuresekretion von $54,64 \pm 6,05$ mittlere Standardabweichung. D-Phe¹¹-Somatostatin bewirkt eine prozentuale Inhibition der Magensäuresekretion von $53,57 \pm 7,32$ mittlere Standardabweichung. L-Cha¹¹-Somatostatin bewirkt eine prozentuale Inhibition der Magensäuresekretion von $81,83 \pm 7,88$ mittlere Standardabweichung. L-Leu¹¹-Somatostatin bewirkt eine Inhibition der Magensäuresekretion von $45,38 \pm 11,70$ mittlere Standardabweichung.

D-Phe¹¹-Somatostatin und L-Cha¹¹-Somatostatin werden auch auf ihre in vivo Inhibition der Magensäuresekre-

tion an Hunden geprüft. Bei 6 Hunden mit chronischer Fistel und Heidenhain-Beutel wird durch Infusion des C-abgeschlossenen Tetrapeptids von Gastrin bei einer Konzentration von 0,5 µ/kg und Stunde Magensalzsäuresekretion induziert. Ein Hund dient als Kontrolle und erhält lediglich das Tetrapeptid. Ein anderer Hund erhält das Tetrapeptid und Somatostatin, wohingegen die Testverbindung statt des Somatostatins an die übrigen Hunde verabreicht wird. Nach 1 Stunde stetiger Sekretion von HCl werden Somatostatin bzw. die Testverbindungen 1 Stunde lang mit einer Geschwindigkeit von 3 µg/kg und Stunde infusiert. Das Sammeln von Magensäureproben wird mit Zwischenräumen von 15 Minuten weitere 1,5 Stunden fortgesetzt. Die Proben werden mit einem automatischen Titriergerät auf pH 7 titriert. Die höchste inhibitorische Wirkung der Testverbindung wird gegen die Dosiswirkungskurve von Somatostatin extrapoliert, und die relative Wirkungsstärke der Analoga im Verhältnis zu der von Somatostatin wird als prozentuale Aktivität ausgedrückt. D-Phe¹¹-Somatostatin inhibiert die durch das C-abgeschlossene Tetrapeptid von Gastrin induzierte Säuresekretion im gleichbleibenden Zustand um $32,19 \pm 6,55\%$ mittlere Standardabweichung. Diese Wirkung ist der von 0,086 µg/kg und Stunde Somatostatin äquivalent. Die Wirksamkeit der Testverbindung im Verhältnis zu der von Somatostatin beträgt somit 2,87%. L-Cha¹¹-Somatostatin inhibiert den durch das C-abgeschlossene Tetrapeptid von Gastrin induzierte Säuresekretion in gleichbleibendem Zustand, um $31,37 \pm 4,08\%$ mittlerer Standardabweichung. Diese Wirkung ist der von 0,0825 µg/kg und Stunde Somatostatin äquivalent. Die Wirksamkeit dieser Verbindung im Verhältnis zu der von Somatostatin beträgt daher 2,7%.

D-Phe¹¹-Somatostatin, L-Cha¹¹-Somatostatin und L-Leu¹¹-Somatostatin werden auch auf ihre Wirksamkeit hinsichtlich der Freisetzung von Wachstumshormon geprüft. Die hierfür angewandte Arbeitsweise wird unter Verwendung von männlichen Sprague-Dawley-Ratten (Laboratory Supply Company, Indianapolis, Indiana) durchgeführt. Der Test ist eine Modifikation der Methode von P. Brazeau, W. Vale und R. Guilleman, *Endocrinology*, Bd. 94 S. 184 (1974). Bei jeder Prüfung werden drei Gruppen von je 8 Ratten eingesetzt. An alle Ratten wird Natriumpentobarbital verabreicht, um die Wachstumshormonsekretion zu stimulieren. Für jede Verbindung dient eine Gruppe als Kontrolle und erhält nun Salzlösung. Eine zweite Gruppe erhält Somatostatin in einer Menge von 50 µg/Ratte, subkutan. Die dritte Gruppe erhält die Testverbindung subkutan in einer Menge von 50 µg/Ratte. Das Ausmass der Inhibition der Serumwachstumshormonsekretion wird dann bezüglich der Kontrollgruppen ermittelt, und die relativen Wirksamkeiten der Testverbindung und von Somatostatin selbst werden verglichen.

Bei der vorstehend beschriebenen Prüfung werden folgende Ergebnisse erhalten:

D-Phe¹¹-Somatostatin inhibiert die Steigerung der Serumwachstumshormonkonzentration um 70% gegenüber der Kontrolle, verglichen mit 57% für Somatostatin. L-Cha¹¹-Somatostatin inhibiert die Steigerung der Serumwachstumshormonkonzentration um 33% gegenüber der Kontrolle, verglichen mit 73% für Somatostatin. L-Leu¹¹-Somatostatin inhibiert die Steigerung der Serumwachstumshormonkonzentration um 22% gegenüber der Kontrolle, verglichen mit 87% für Somatostatin.

Die Tetradecapeptide werden noch auf ihre in vivo Aktivität der Inhibition der Glucagon- und Insulinsekretion nach Stimulierung mit L-Alanin geprüft. Normale mischrasige Hunde beiderlei Geschlechts werden über Nacht ohne Futter belassen. Nach Abnehmen einer Blutprobe zur Kon-

trolle wird mit der intravenösen Infusion von Salzlösung, Somatostatin bzw. Testverbindung begonnen. 30 Minuten später wird L-Alanin zusätzlich intravenös 25 Minuten lang verabreicht. Die Infusion von Salzlösung, Somatostatin bzw. Testverbindung wird nach dem Ende der L-Alanininfusion noch 15 Minuten fortgesetzt. Die infusierte Gesamtdosis von Somatostatin bzw. Testverbindung beträgt 200 bis 500 µg/Hund (etwa 0,20 bis 0,30 µg/kg und Minute) und die Gesamtdosis des infusierten L-Alanins beträgt 1 mMol/kg. Die Infusion von L-Alanin verursacht einen abrupten Anstieg der Serumkonzentration von Glucagon und Insulin, die nach dem Ende der L-Alanininfusion auf die Kontrollkonzentration absinkt.

Die Somatostatininfusion bewirkt eine Abnahme der Insulinkonzentration des Grundserums und inhibiert den Anstieg der Konzentration von Glucagon und Insulin während der Infusion von L-Alanin. Verglichen damit hat D-Phe¹¹-Somatostatin bei einer Infusionsgeschwindigkeit von 0,211 µg/kg und Minute keine Wirkung auf die Erhöhung der Serumglucagonkonzentration und der Seruminsulinkonzentration, die durch die Infusion von L-Alanin bewirkt wird.

Mit einer Geschwindigkeit von 0,235 µg/kg und Minute infusiertes L-Cha¹¹-Somatostatin verursacht eine Verringerung der Konzentration des Grundserums an Insulin und Glucagon, aber es inhibiert die Zunahme der Serumkonzentration dieser beiden Hormone nicht, die sich bei der Infusion von L-Alanin ergibt. Mit einer Geschwindigkeit von 0,195 µg/kg und Minute infusiertes L-Leu¹¹-Somatostatin hat keine Wirkung auf die Konzentration von Insulin und Glucagon im Grundserum und keine Wirkung auf die Erhöhung der durch L-Alanin bewirkten Glucagonkonzentra-

tion und führt nur zu einer teilweisen Inhibierung der Zunahme der durch L-Alanininfusion bewirkten Insulinsekretion.

Die Tetradecapeptide werden auch bezüglich ihrer in vivo Wirksamkeit der Inhibierung der Glucagonsekretion nach dem Stimulieren mit Insulin bewertet. Normale mischrassige Hunde beiderlei Geschlechts werden über Nacht ohne Futter gelassen. Nach dem Entnehmen von Kontrollblutproben wird mit einer intravenösen Infusion von Salzlösung, Somatostatin bzw. Testverbindung begonnen. Nach 15 Minuten werden 0,3 Einheiten/kg Insulin intravenös injiziert. Die Infusion von Salzlösung, Somatostatin bzw. Testverbindung wird 2 Stunden fortgesetzt und während des gesamten Tests werden zu verschiedenen Zeitpunkten Blutproben entnommen. Die Gesamtdosis des Somatostatins bzw. der Testverbindung liegt im Bereich von 120 bis 260 µg/Hund (0,07 bis 0,13 µg/kg und Minute). Die Verabreichung von Insulin führt zu einer Verminderung der Glukosekonzentration im Blut und einer Erhöhung der Glucagonkonzentration im Serum. Die Infusion von Somatostatin blockiert die Erhöhung der Glucagonkonzentration im Serum, hat aber keinerlei Einfluss auf die Verringerung der Glukosekonzentration im Blut.

Wenn zum Vergleich anstelle von Somatostatin D-Phe¹¹-Somatostatin mit einer Geschwindigkeit von 0,128 µg/kg und Minute, L-Cha¹¹-Somatostatin mit einer Geschwindigkeit von 0,13 µg/kg und Minute oder L-Leu¹¹-Somatostatin mit einer Geschwindigkeit von 0,129 µg/kg und Minute infusiert wird, ergibt sich, dass keine dieser Verbindungen den Anstieg der Glucagonkonzentration im Serum, der durch Insulinverabreichung bewirkt wird, inhibiert.