



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

① CH 664 968 A5

⑤ Int. Cl.4: C 07 K 7/20
A 61 K 37/43

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

⑫ PATENTSCHRIFT A5

⑮ Gesuchsnummer: 6073/84

⑳ Anmeldungsdatum: 20.12.1984

㉓ Priorität(en): 23.12.1983 HU 4458/83

㉕ Patent erteilt: 15.04.1988

㉗ Patentschrift
veröffentlicht: 15.04.1988

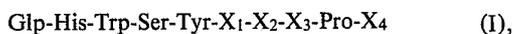
㉚ Inhaber:
Központi Valto- és Hitelbank Rt., Budapest X
(HU)

㉛ Erfinder:
Gulyas, Tamas, Szekszard (HU)
Horvath, Aniko, Dr., Budapest (HU)
Kéri, György, Dr., Budapest (HU)
Nikolics, Karoly, Dr., Budapest (HU)
Szöke, Balazs, Dr., Budapest (HU)
Teplan, Istvan, Dr., Budapest (HU)

㉜ Vertreter:
Patentanwälte Schaad, Balass, Sandmeier, Alder,
Zürich

㉞ Gonadoliberin-Derivate und Verfahren zu ihrer Herstellung.

㉟ Die neuen Nonapeptid-C₁₋₄-alkylamide beziehungs-
weise Dekapeptidamide entsprechen der allgemeinen
Formel I



worin

X₁ für Glycylgruppe oder eine natürliche oder syntheti-
sche D-Aminosäuregruppe,

X₂ für L-Phenylalanyl- oder L-Tryptophylgruppe oder
eine L-Aminosäuregruppe mit 1 - 4 Kohlenstoffato-
men in der Seitenkette,

X₃ für eine als Seitenkette eine Alkylgruppe mit 1 - 4 Koh-
lenstoffatomen oder eine Carbamylalkylgruppe mit 2
- 4 Kohlenstoffatomen enthaltende L-Aminosäure-
gruppe und

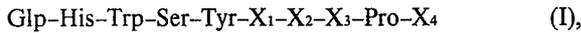
X₄ für Glycylamidgruppe oder eine Alkylamidgruppe mit
1 - 4 Kohlenstoffatomen steht

mit der Einschränkung, dass - falls X₁ eine andere Bedeu-
tung hat als Glycylgruppe und X₂ für Tryptophylgruppe
steht - X₃ eine andere Bedeutung als Leucylgruppe hat.

Die neuen Gonadoliberin-Derivate enthalten in 7-
und 8-Stellung die für die Gonadotropine der Fische
charakteristischen Aminosäurekombinationen und kön-
nen deshalb zur Vermehrung dieser Tiergattung eingesetzt
werden.

PATENTANSPRÜCHE

1. Gonadoliberin-Derivate der allgemeinen Formel I



worin

X₁ für Glycylgruppe oder eine natürliche oder synthetische D-Aminosäuregruppe,

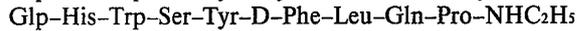
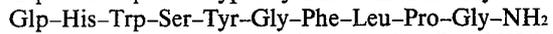
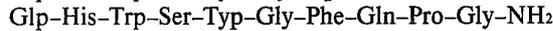
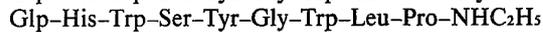
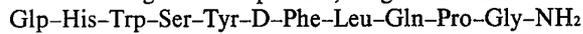
X₂ für L-Phenylalanyl- oder L-Tryptophylgruppe oder eine L-Aminosäuregruppe mit 1-4 Kohlenstoffatomen in der Seitenkette,

X₃ für eine als Seitenkette eine Alkylgruppe mit 1-4 Kohlenstoffatomen oder eine Carbamylalkylgruppe mit 2-4 Kohlenstoffatomen enthaltende L-Aminosäuregruppe und

X₄ für Glycylamidgruppe oder eine Alkylamidgruppe mit 1-4 Kohlenstoffatomen steht

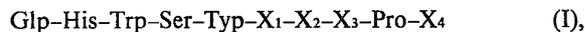
mit der Einschränkung, dass - falls X₁ eine andere Bedeutung hat als Glycylgruppe und X₂ für Tryptophylgruppe steht - X₃ eine andere Bedeutung als Leucylgruppe hat, sowie deren physiologisch verträgliche Säureadditionssalze und/oder Metallkomplexe.

2. Verbindung nach Anspruch 1, ausgewählt unter



und ihren physiologisch verträglichen Säureadditionssalzen und Metallkomplexen.

3. Verfahren zur Herstellung von Gonadoliberin-Derivaten der allgemeinen Formel I



worin

X₁ für Glycylgruppe oder eine natürliche oder synthetische D-Aminosäuregruppe,

X₂ für L-Phenylalanyl- oder L-Tryptophylgruppe oder eine L-Aminosäuregruppe mit 1-4 Kohlenstoffatomen in der Seitenkette,

X₃ für eine als Seitenkette eine Alkylgruppe mit 1-4 Kohlenstoffatomen oder eine Carbamylalkylgruppe mit 2-4 Kohlenstoffatomen enthaltende L-Aminosäuregruppe und

X₄ für Glycylamidgruppe oder eine Alkylamidgruppe mit 1-4 Kohlenstoffatomen steht

mit der Einschränkung, dass - falls X₁ eine andere Bedeutung hat als Glycylgruppe und X₂ für Tryptophylgruppe steht - X₃ eine andere Bedeutung als Leucylgruppe hat, und ihren physiologisch verträglichen Säureadditionssalzen und Metallkomplexen, dadurch gekennzeichnet, dass man die Verbindungen der Formel Ia) unter Anwendung der Methode der Festphasensynthese aus den entsprechend geschützten Aminosäuren schrittweise in der gewünschten Reihenfolge durch Koppeln mit Carbodiimid oder über einen aktiven Ester am festen Träger aufbaut und das Endprodukt durch saures oder basisches Abspalten von dem Träger ablöst und die Schutzgruppen vor, während oder nach dem Abspalten vom Träger ebenfalls abspaltet, oder

b) die Verbindung der Formel I aus geschützten Aminosäuren durch entsprechende Kombinationen von schrittweiser Kondensation und Fragmentkondensation aufbaut.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass man als festen Träger Benzhydrylaminharz oder BOC-Prolinharz verwendet.

5. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass man das geschützte Peptid durch Behandeln mit Fluor-

2

wasserstoff und/oder durch Äthylammonolyse vom Harz ablöst.

6. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass man das Pentapeptidazid der Formel II

5



mit einem Tetra- oder Pentapeptid der allgemeinen Formel III

10



worin die Bedeutung von X₁, X₂, X₃ und X₄ die gleiche wie in Anspruch 3 ist, kondensiert.

7. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass man ein Hexapeptidazid der allgemeinen Formel IV

15



20 mit einem Tri- oder Tetrapeptid der allgemeinen Formel V

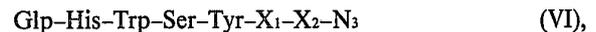
20



worin die Bedeutung von X₁, X₂, X₃ und X₄ die gleiche wie in Anspruch 3 ist, kondensiert.

8. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass man ein Heptapeptidazid der allgemeinen Formel VI

30



worin die Bedeutung von X₁ und X₂ die gleiche wie in Anspruch 3 ist, mit einem Di- oder Tripeptid der allgemeinen Formel VII

35



worin die Bedeutung von X₃ und X₄ die gleiche wie in Anspruch 3 ist, kondensiert.

9. Pharmazeutische Präparate, gekennzeichnet durch einen Gehalt an wenigstens einer Verbindung der allgemeinen Formel I, worin die Bedeutung von X₁, X₂, X₃ und X₄ die gleiche wie in Anspruch 1 ist, oder deren physiologisch verträglichen Säureadditionssalzen oder Metallkomplexen.

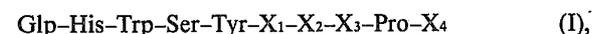
10. Verfahren zur Herstellung pharmazeutischer Präparate nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass man Verbindungen der allgemeinen Formel I, worin die Bedeutung von X₁, X₂, X₃ und X₄ die gleiche wie in Anspruch 1 ist, oder ihre physiologisch verträglichen Säureadditionssalze und Metallkomplexe mit pharmazeutischen Träger- und Hilfsstoffen vermischt.

50

BESCHREIBUNG

Die Erfindung betrifft neue Gonadoliberin-Derivate, deren Salze und Metallkomplexe sowie ein Verfahren zu ihrer Herstellung. Die neuen Nonapeptid-C₁₋₄-alkylamide beziehungsweise Dekapeptidamide entsprechen der allgemeinen Formel I

60



worin

65 X₁ für Glycylgruppe oder eine natürliche oder synthetische D-Aminosäuregruppe,

X₂ für L-Phenylalanyl- oder L-Tryptophylgruppe oder eine L-Aminosäuregruppe mit 1-4 Kohlenstoffatomen in der

Seitenkette,
 X_3 für eine als Seitenkette eine Alkylgruppe mit 1–4 Kohlenstoffatomen oder eine Carbamylalkylgruppe mit 2–4 Kohlenstoffatomen enthaltende L-Aminosäuregruppe und
 X_4 für Glycylamidgruppe oder eine Alkylamidgruppe mit 1–4 Kohlenstoffatomen steht
 mit der Einschränkung, dass – falls X_1 eine andere Bedeutung hat als Glycylgruppe und X_2 für Tryptophylgruppe steht – X_3 eine andere Bedeutung als Leucylgruppe hat.

Die in der Formel verwendeten Symbole entsprechen der in der Peptidchemie üblichen Nomenklatur (s. z.B. J. Biol. Chem. 241, 527 [1966]).

Das Gonadoliberin (es wird in der Fachliteratur auch als gonadotropin releasing hormone Gn–RH, luteinisierendes und Follikel stimulierendes Hormon, releasing hormone, LH/FSH–RH bezeichnet) und seine bekannten Derivate haben die allgemeine Eigenschaft, zur Freisetzung der luteinisierenden und Follikel stimulierenden Hormone (LH und FSH) fähig zu sein.

Zu Beginn der achtziger Jahre wurde bekannt, dass sich die Struktur des Gonadoliberins mancher Fische von der Struktur des Gonadoliberins der Säugetiere unterscheidet (J.A. King und R.P. Millar, J. Biol. Chem. 257, 10722–28 [1982]; South-African Journal of Science 78, 124 [1982]; N. Sherwood et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 80, 2794–2798 [1983]). Dieser Unterschied wird von der an 7. beziehungsweise 8. Stelle befindlichen Aminosäure verursacht.

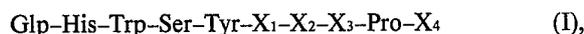
Aus der Literatur ist ferner bekannt, dass die statt des Glycins in 6-Stellung gewisse D-Aminosäuren enthaltenden Gonadoliberin-Derivate eine stärkere Wirkung haben als das Gonadoliberin selbst (J. Sandow et al.: Control of Ovulation, Butterworth, London 1978, S. 49–70).

Bekannt ist auch, dass durch Austausch der Glycinamidgruppe in 10-Stellung gegen Amidgruppen mit aliphatischen Ketten die biologische Wirksamkeit des Gonadoliberins weiter erhöht werden kann (M. Fujino et al., J. Med. Chem. 16, 1144–1147 [1973]).

Ziel der Erfindung ist die Herstellung neuer Gonadoliberin-Derivate, die in der Vermehrung von Fischen wirksam eingesetzt werden können. Ein weiteres Ziel der Erfindung besteht darin, von diesen Verbindungen Derivate herzustellen, die vorteilhaftere biologische Eigenschaften zeigen als die Grundverbindungen.

Die Erfindung beruht auf der Erkenntnis, dass durch Austausch der in 7- und 8-Stellung befindlichen Aminosäuren des Gonadoliberins beziehungsweise durch gewisse Kombinationen dieses Austauschs Gonadoliberin-Derivate hergestellt werden können, die zur Vermehrung von Fischen geeignet sind. Die Erfindung beruht ferner auf der Erkenntnis, dass die biologische Wirksamkeit der durch Austausch der in 7- und 8-Stellung befindlichen Aminosäuren des Gonadoliberins entstandenen Gonadoliberin-Derivate durch Austausch der Glycingruppe in 6-Stellung gegen gewisse D-Aminosäuren beziehungsweise der Glycinamidgruppe in 10-Stellung gegen Alkylamidgruppen noch erhöht werden kann.

Zum Gegenstand der Erfindung gehört ferner auch ein Verfahren zur Herstellung der Nonapeptid- C_{1-4} -alkylamide beziehungsweise Dekapeptidamide der allgemeinen Formel I



worin die Bedeutung von X_1 , X_2 , X_3 und X_4 die gleiche wie oben ist, sowie ihrer Salze und Metallkomplexe.

Die Verbindungen der allgemeinen Formel I werden erfindungsgemäss hergestellt, indem man

a) unter Anwendung der Methode der Festphasensynthese aus den entsprechend geschützten Aminosäuren schrittweise in der gewünschten Reihenfolge durch Koppeln mit Carbo-

diimid oder über einen aktiven Ester am festen Träger aufbaut und das Endprodukt durch saures oder basisches Abspalten von dem Träger ablöst und die Schutzgruppen vor, während oder nach dem Abspalten vom Träger ebenfalls

abspaltet, oder
 b) aus geschützten Aminosäuren durch entsprechende Kombinationen von schrittweiser Kondensation und Fragmentkondensation aufbaut.

Als fester Träger wird zweckmässig Benzhydrylaminharz oder BOC-Prolinharz verwendet.

Das Schutzgruppen enthaltende Endprodukt wird zweckmässig durch Abspalten mit Fluorwasserstoff und/oder durch Äthylammonolyse vom Harz abgespalten.

Von den unter b) genannten Kombinationen sind besonders die folgenden bevorzugt: das Pentapeptidazid der Formel (II)



wird mit einem Tetra- oder Pentapeptid der allgemeinen Formel (III)



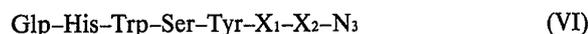
kondensiert; oder ein Hexapeptidazid der allgemeinen Formel (IV)



wird mit einem Tri- oder Tetrapeptid der allgemeinen Formel (V)



kondensiert; oder ein Heptapeptidazid der allgemeinen Formel (VI)



wird mit einem Di- oder Tripeptid der allgemeinen Formel (VII)



kondensiert.

In den Formeln (III) bis (VII) ist die Bedeutung von X_1 , X_2 , X_3 und X_4 die gleiche wie oben angegeben.

Das gebildete Nona- beziehungsweise Dekapeptidamid kann gewünschtenfalls durch Umsetzen mit einer physiologisch verträglichen Säure zu einem Säureadditionssalz umgesetzt werden. Aus dem Säureadditionssalz kann gewünschtenfalls durch Behandeln mit einer Base die Verbindung freigesetzt und gewünschtenfalls das Nona- beziehungsweise Dekapeptidamid zu einem Metallkomplex umgesetzt werden.

Die Verbindungen der allgemeinen Formel (I) können gewünschtenfalls zu Arzneimittelpräparaten formuliert werden. Zu diesem Zweck werden die Verbindungen der allgemeinen Formel (I) oder ihre physiologisch verträglichen Säureadditionssalze oder ihre Metallkomplexe zusammen mit den in der Arzneimittelherstellung üblichen Träger- und/oder Hilfsstoffen zu Tabletten, Dragées, Kapseln, Suppositorien, Injektionslösungen, Nasensprays usw. formuliert.

Die Gonadoliberin-Derivate der allgemeinen Formel (I) werden den Fischen durch intramuskuläre oder subkutane Injektion appliziert und sind in einem Dosisbereich von 0,1 μg bis 5 mg wirksam.

Der Hauptvorteil der Erfindung besteht darin, dass die neuen Gonadoliberin-Derivate in 7- und 8-Stellung für Fische

charakteristische Aminosäurekombinationen enthalten und deshalb zur Vermehrung dieser Tiergattung erfolgreich eingesetzt werden können.

Die Erfindung wird an Hand der folgenden Beispiele näher erläutert. Gemäss den Beispielen 1–5 wurden die Verbindungen mit den allgemein üblichen Methoden der Peptidsynthese in der festen Phase (Merrifield, R.B., J. Am. Chem. Soc. 85, 2149–2151 [1963]) hergestellt. Abhängend von der Struktur der herzustellenden Verbindung ging man im Falle eines Peptidalkylamides von chlormethylierten Polystyrol-Divinylbenzol-Harzen, im Falle von Peptidsäureamiden von Benzhydrylaminharzen aus. Die einzelnen Aminosäuren wurden mit Hilfe von Diisopropylcarbodiimid (DIC) beziehungsweise Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) in Form ihrer mit t-Butoxycarbonyl (BOC) geschützten Derivate beziehungsweise mit der Methode des aktiven Esters schrittweise an das Harz gekoppelt.

Der Verlauf der Kupplungsreaktion wurde mit dem Ninhydrin-Test (Kaiser, E., Colescott, R.L., Bossinger, C.D., Cook, P.I., Anal. Biochem. 34, 595–598 [1970]) verfolgt. Bei Anzeige freier Aminogruppen wurde die Acylierung wiederholt. Die Zeitdauer der Kupplungsreaktionen beträgt abhängig von den Aminosäuren 1 bis 16 Stunden.

Das Abspalten der Schutzgruppen und das Abspalten des Peptids von dem Harz kann mit flüssigem, wasserfreiem Fluorwasserstoff in einem Schritt erfolgen (Sakakibara S., Shimomishi Y., Kishida Y., Okada M., Sugikara H., Bull. Soc. Japan 40, 2164–2167 [1967]). Bei der Verwendung von N^m-Dinitrophenyl wird die Entfernung der Schutzgruppe noch vor der mit HF vorgenommenen Abspaltung durchgeführt. Das geschützte Peptidharz wird in propylaminhaltigem Dimethylformamid verrührt und nach Entfernung des Lösungsmittels in der üblichen Weise mit HF behandelt. Ist die hergestellte Verbindung ein Peptidalkylamid, so wird das Peptid durch Alkylammonolyse von dem Harz abgetrennt und dann – abhängig von dem Charakter der Schutzgruppen – katalytisch hydriert und/oder sauer hydrolysiert.

Das rohe Produkt wird nach dem mit HF vorgenommenen Abtrennen durch Gelfiltration gereinigt. Dazu dient eine Säule aus Sephadex G25, eluiert wird mit essigsäuren Lösungen.

Zur weiteren Reinigung werden HPLC-Säulen (Hochdruckflüssigkeitschromatographie) und/oder Silikagelchromatographie herangezogen. Die Reinheit der Peptide wird durch Aminosäureanalyse und mittels Dünnschichtchromatographie untersucht. Die R_F-Werte der Dünnschichtchromatographie wurden an Kieselgel (DC Alufolie, Merck) mit den folgenden Lösungsmittelgemischen ermittelt:

1. Äthylacetat/Pyridin/Essigsäure/Wasser 30:20:6:11
2. Äthylacetat/Pyridin/Essigsäure/Wasser 60:20:6:11
3. Äthylacetat/Pyridin/Essigsäure/Wasser 120:20:6:11
4. Äthylacetat/Pyridin/Essigsäure/Wasser 240:20:6:11
5. n-Butanol/Essigsäure/Wasser/Äthylacetat 1:1:1:1
6. n-Butanol/Essigsäure/Wasser 4:1:1
7. i-Propanol/1M Essigsäure 2:1
8. Äthylacetat/Pyridin/Essigsäure/Wasser 5:5:1:3
9. n-Butanol/Essigsäure/Ammoniak (conc., Ammoniak und H₂O = 1:4)/Wasser 6:1:1:2
10. Methyläthylketon/Essigsäure/Wasser 125:15:20

Beispiel 1

D-Phe⁶, Gln⁸-Gonadoliberin (M: 1243)

a) Synthese

1,25 g (1 mMol) Benzhydrylaminhydrochlorid-Harz [0,8 mM/g, Pierce] werden 2 Stunden lang in Dichlormethan gequell. Bei der Acylierung mit den Aminosäuren wird jeweils der folgende Zyklus wiederholt:

Schritt	Reagens, Arbeitsgang	Rührdauer, min
5	1 CH ₂ Cl ₂ , Waschen 3 ×	1
	2 33% Trifluoressigsäure im Gemisch mit 67% CH ₂ Cl ₂ , Waschen 3 ×	1
3	(dito)	25
4	CH ₂ Cl ₂ , Waschen 3 ×	1
10	5 CHCl ₃ , Waschen 2 ×	1
	6 Gemisch aus 10% Triäthylamin und 90% CHCl ₃ , Waschen 2 ×	2
7	CHCl ₃ , Waschen 2 ×	1
8	Äthanol, Waschen 2 ×	1
15	9 CH ₂ Cl ₂ , Waschen 2 ×	1
	10 3 mMol BOC-Aminosäure, in Dichlormethan gelöst*, und 3 mMol DCC oder DIC, in CH ₂ Cl ₂ gelöst	60 (verschieden)
20	11 CH ₂ Cl ₂ , Waschen 2 ×	1
	12 Äthanol, Waschen 2 ×	1

25 * Bei Kopplung von Gln wird mit der Methode des aktiven Esters über BOC-Gln-ONP gekoppelt; im Falle von Pyroglutaminsäure wurde ohne Schutzgruppe gearbeitet.

30 Nach dem letzten Schritt beträgt das Gewicht des Glp-His(Tos)-Trp-Ser(OBzl)-Tyr(OBzl)-D-Phe-Leu-Gln-Pro-Gly-Peptidharzes 2,28 g.
ΔW: 1,05 g (66%) (M_{gesch. Peptid}: 1577)

b) Abspalten mit HF

35 Zu dem Harz werden 3 ml Anisol und 100 mg Dithiothreit gegeben, dann werden in dem Gemisch 30 ml HF kondensiert. Das Gemisch wird bei 0 °C eine Stunde lang gerührt. Anschliessend wird der Fluorwasserstoff im Stickstoffstrom entfernt, der Rückstand wird in absolutem Äther suspendiert und dann filtriert. Der feste Rückstand wird in 50%iger Essigsäure gewaschen. Das Filtrat wird bei 37 °C eingedampft. Der Rückstand wurde unmittelbar der Gelchromatographie zugeführt (s. folgenden Punkt).

c) Gelchromatographie

45 Die gemäss dem vorhergehenden Punkt erhaltene Substanz wurde an einer Säule aus Sephadex G25 (2,5 × 100 cm) mit 50%iger Essigsäure als Elutionsflüssigkeit gereinigt. Die Elution wurde mittels der Absorption von UV-Licht der Wellenlänge 280 nm sowie mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt. Die Elutionsgeschwindigkeit beträgt 15 ml/h. Die Fraktionen zwischen 300 ml und 350 ml werden gesammelt und lyophilisiert. Gewicht: 690 mg (55%).

d) Präparative Hochdruckflüssigkeitschromatographie

55 Es wurde eine präparative HPLC-Säule der Masse 2,5 × 45 cm (C₁₈-Silikagel LRP-1, 13–24 μm; Whatman) verwendet. Diese wurde mit einem Gemisch aus 25% Methanol und 75% 30%iger Essigsäure äquilibriert. Nach Einstellen des Gleichgewichtes werden 230 mg der gelchromatisch gereinigten Substanz, gelöst in dem gleichen Lösungsmittelgemisch, auf die Säule aufgebracht. Eluiert wurde mit einem Methanol/Essigsäure-Gradienten, dessen Zusammensetzung sich zwischen 25% Methanol/75% 30%ige Essigsäure und 40% Methanol/60% 30%ige Essigsäure linear ändert.

60 Die Elutionsgeschwindigkeit beträgt 2 ml/min, der Druck 3,5 · 10⁵ Pa. Die Fraktionen werden mit UV-Licht der Wellenlänge 280 nm detektiert, ihr Gehalt wird dünnschichtchroma-

tographisch kontrolliert. Das Gewicht des reinen Endproduktes D-Phe⁶, Gln⁸-GnRH beträgt nach dem Lyophilisieren 133 mg. Das entspricht, auf die Gesamtmenge der Substanz bezogen, 399 mg (32%) an gereinigtem Endprodukt.

$$R_1^1 = 0,76 \quad R_2^1 = 0,68 \quad R_3^1 = 0,33 \quad R_4^1 = 0,93 \quad R_5^1 = 0,83$$

Aminosäureanalyse:

Gly: 1,02 Pro: 0,95 Leu: 1,00 Phe: 1,02

Tyr: 1,01 Ser: 0,93 His: 0,99 Glu: 1,96

Schmp.: 175–178 °C; $[\alpha]_D^{25} = -68^\circ$ (c=0,1, 0,1 M AcOH)

Beispiel 2

Trp⁷, Gln⁸-Gonadoliberin (M: 1226)

a) Synthese

Ausgehend von 2,5 g (1 mM) Benzhydrylaminhydrochloridharz [0,4 mÄqu./g] wird auf die im Beispiel 1 unter Punkt a) beschriebene Weise das Peptidharz Glp-His(DNP)-Trp-Ser(OBzl)-Tyr-Gly-Trp-Gln-Pro-Gly-Harz hergestellt. Das Gewicht des Peptidharzes beträgt 3,62 g

$$\Delta W: 1,12 \text{ g (76\%)} (M_{\text{gesch. Peptid}}: 1468)$$

b) Entfernung der Schutzgruppen und Abspalten des Peptids vom Harz

Abspalten der Dinitrophenyl-Schutzgruppe (DNP)

Das Peptidharz wird in dem Gemisch aus 20 ml Dimethylformamid und 1 ml Propylamin bei Raumtemperatur eine Stunde lang gerührt. Anschliessend wird das Harz abfiltriert und mit Dichlormethan, dann mit Äthanol gewaschen.

Spaltung mit HF

Nach der Entfernung der Dinitrophenyl-Schutzgruppe werden auf die im Beispiel 1 unter Punkt b) beschriebene Weise das Peptid vom Harz beziehungsweise die Schutzgruppen vom Peptid abgespalten. Nach Abschluss der beiden Schritte verbleiben 0,8 g (65%) Substanz.

c) Gelchromatographie

Man arbeitet auf die im Beispiel 1 unter Punkt c) angegebene Weise. Das Gewicht der gesammelten und lyophilisierten Fraktionen beträgt 520 mg (42%).

d) Präparative Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Man arbeitet auf die im Beispiel 1 unter Punkt d) angegebene Weise mit dem Unterschied, dass die Äquilibriumierung mit einem Gemisch aus 18% Methanol und 82% 30%iger Essigsäure vorgenommen wird. Die gelchromatographisch gereinigte Substanz wird mit einem Methanol/Essigsäure-Gemisch, dessen Zusammensetzung sich zwischen 18% Methanol/82% 30%ige Essigsäure und 35% Methanol/65% 30%ige Essigsäure linear ändert, von der Säule eluiert. Die Fraktionierung sowie die sonstigen Bedingungen stimmen mit denen in Beispiel 1d) überein. Das Gewicht des lyophilisierten Endproduktes beträgt 380 mg (31%).

$$R_1^1 = 0,66 \quad R_2^1 = 0,57 \quad R_3^1 = 0,78$$

Aminosäureanalyse:

Glu: 1,93 Gly: 2,04 Pro: 1,00 Tyr: 0,98

Ser: 0,93 Trp: 1,86 His: 1,03

Beispiel 3

Trp⁷, Leu⁸, desGlyNH₂¹⁰-Gonadoliberin-äthylamid (M = 1198)

a) Synthese

Als erster Schritt der Synthese wird BOC-Pro in literaturbekanntere Weise (Merrifield, R.B., J. Am. Chem. Soc. 86, 304 [1964]) an ein chlormethyliertes Polystyrolharz gekoppelt. 2 g des auf diese Weise erhaltenen BOC-Pro-Harzes [0,5 mÄqu./g] werden zwei Stunden lang in Dichlormethan gequellt, und dann werden auf die unter Punkt a) in Beispiel 1 beschriebene Weise schrittweise die entsprechenden

geschützten Aminosäuren an das Harz gekoppelt. Nach dem letzten Zyklus erhält man 3,02 g des Peptidharzes Glp-His(DNP)-Trp-Ser(OBzl)-Tyr(OBzl)-Gly-Trp-Leu-Pro.

$$\Delta W: 1,02 \text{ g (83\%)} (M_{\text{gesch. Peptid}}: 1486)$$

b) Entfernung der Schutzgruppen und Abspalten des Peptids vom Harz

Zuerst wird gemäss Punkt b) des Beispiels 2 die Dinitrophenyl-Schutzgruppe von dem Histidin abgetrennt.

Anschliessend wird das Peptid in Form des Äthylamids vom Harz abgespalten (Coy, D.H., et al., Biochemistry 13, 323–326 [1974]). Zu diesem Zweck werden auf das geschützte Peptidharz 15 ml Äthylamin aufkondensiert, und das Gemisch wird bei 0 °C 3 Stunden lang gerührt. Der Überschuss des Amins wird mittels Stickstoff ausgetrieben. Dann wird mit Methanol, anschliessend mit Dimethylformamid gewaschen. Die DMF-Lösung wird eingedampft und das als Eindampfrückstand erhaltene Öl mit Äther verrieben. Der Niederschlag wird abfiltriert.

Die auf diese Weise erhaltene Festsubstanz wird gemäss Punkt b) des Beispiels 1 zwecks Entfernung der Schutzgruppen mit gasförmigem Fluorwasserstoff behandelt. Man erhält 710 mg (59%) Nonapeptidäthylamid.

c) Gelchromatographie

Man arbeitet auf die unter Punkt c) des Beispiels 1 beschriebene Weise mit einer Säule aus Sephadex G25 und verwendet als Elutionsmittel 30%ige Essigsäure. Das Gewicht der gesammelten und lyophilisierten Fraktionen beträgt 490 mg (41%).

Das rohe Peptid wird an einer Säule aus Kieselgel 60 (230–400 mesh, Merck) der Masse 2 × 100 cm weiter gereinigt. Eluiert wird mit einem Gemisch aus Äthylacetat, Pyridin, Essigsäure und Wasser im Verhältnis 30:20:6:11. Die Durchflussgeschwindigkeit beträgt 8 ml/h. Fraktionen zu je 4 ml werden aufgefangen, und die Elution wird dünnschichtchromatographisch verfolgt.

Die dem Gonadoliberinäthylamid Trp⁷, Leu⁸, des GlyNH₂¹⁰ entsprechenden Fraktionen werden auf Grund der Aminosäureanalyse bestimmt. Man erhält 320 mg (26%) lyophilisiertes Material.

$$R_1^1 = 0,61 \quad R_2^1 = 0,42 \quad R_3^1 = 0,75$$

Aminosäureanalyse:

Glu: 0,96 Gly: 0,97 Pro: 0,95 Leu: 1,00

Ser: 0,89 Tyr: 1,02 Trp: 1,88 His: 1,03

Beispiel 4

Phe⁷, Gln⁸-Gonadoliberin (M = 1187)

a) Synthese

1,25 g (1 mMol) Benzhydrylaminhydrochlorid-Harz (0,8 mÄqu./g) lässt man zwei Stunden lang in Dichlormethan quellen. Daraus werden auf die im Beispiel 1a) beschriebene Weise 2,9 g des Peptidharzes Glp-His(Tos)-Trp-Ser(OBzl)-Tyr(OBzl)-Gly-Phe-Gln-Pro-Gly-Harz hergestellt.

$$\Delta W: 1,27 \text{ g (83\%)} (M_{\text{gesch. Peptid}}: 1521)$$

b) Abspalten der Schutzgruppen

Das geschützte Peptid wird auf die im Beispiel 1b) beschriebene Weise mit wasserfreiem HF behandelt. 980 mg (82%) ungeschütztes Peptid werden erhalten.

c) Gelfiltration

Das rohe Decapeptidamid wird auf die im Beispiel 1c) beschriebene Weise an einer mit Sephadex G-25 gefüllten Säule mit 2 M Essigsäure gereinigt. Ausbeute: 576 mg (49%).

d) Präparative HPL-Chromatographie

Man arbeitet auf die im Beispiel 1d) beschriebene Weise

mit dem Unterschied, dass das Gel LRP-1 mit einer 10% Methanol und 20% Essigsäure enthaltenden wässrigen Lösung äquilibriert wird. Eluiert wird mit einem linearen Gradienten, der in 20%iger Essigsäure von 10% aus ansteigend bis zu 25% Methanol enthält (2×150 ml). Dann wird die Elution mit einem zwischen 25% und 40% ansteigend Methanol enthaltenden linearen Gradienten (2×150 ml) fortgesetzt. Die das reine Peptid enthaltenden Fraktionen werden gesammelt und eingedampft.

Ausbeute: 448 mg (38%)

$R_f^1 = 0,12$ $R_f^2 = 0,7$ $R_f^3 = 0,24$ $R_f^4 = 0,87$

Aminosäureanalyse:

Ser: 0,87 Glu: 2,05 Pro: 1,03 Gly: 2,13

Tyr: 0,92 Phe: 1,00 His: 0,95 Trp: 0,81

Schmp.: 182 °C

Beispiel 5

Phe⁷,Leu⁸-Gonadoliberin (M = 1172)

a) Synthese

0,62 g (0,5 mMol) Benzhydrolaminhydrochlorid-Harz (0,8 mÄqu./g) lässt man zwei Stunden lang in Dichlormethanquellen. Dann wird auf die im Beispiel 1a) beschriebene Weise das Peptidharz Glp-His(Tos)-Trp-Ser(OBzl)-Tyr(OBzl)-Gly-Phe-Leu-Pro-Gly-Harz hergestellt.

Ausbeute: 1,33 g.

ΔW : 695 mg (92%) ($M_{\text{gesch. Peptid}}$: 1506)

b) Behandeln mit HF

Das geschützte Peptid wird auf die im Beispiel 1b) beschriebene Weise mit wasserfreiem HF behandelt. Man erhält 510 mg (87%) rohes Decapeptid.

c) Gelfiltration

Das gemäss Schritt b) erhaltene rohe Decapeptidamid wird auf die im Beispiel 1c) beschriebene Weise an einer Säule aus Sephadex G-25 mit 2 M Essigsäure gereinigt. Ausbeute: 363 mg (62%).

d) Chromatographie an Silikagel

Zur weiteren Reinigung des Peptids dient eine mit Kieselerde gefüllte Säule der Masse 2×100 cm, die mit einem im Verhältnis 1:1:1:1 bereiteten Gemisch aus n-Butanol, Essigsäure, Wasser und Äthylacetat eluiert wird. Der Gehalt der Fraktionen wird UV-spektroskopisch sowie mittels Dünnschichtchromatographie kontrolliert. Man erhält 299 mg (51%) des reinen Decapeptidamids.

$R_f^1 = 0,55$ $R_f^2 = 0,39$ $R_f^3 = 0,62$ $R_f^4 = 0,73$

Aminosäureanalyse:

Ser: 0,91 Glu: 0,97 Pro: 1,07 Gly: 2,12

Leu: 1,00 Tyr: 1,03 Phe: 0,94 His: 1,05

Beispiel 6

D-Phe⁶,Hln⁸,desGlyNH¹⁰-Gonadoliberin-äthylamid (M = 1198)

a) BOC-His(DNP)-Trp-OMe (M = 622,52)

21,12 g (50 mMol) BOC-His(DNP)-OH werden in 100 ml Dimethylformamid gelöst. Die Lösung wird auf 0 °C gekühlt und unter Rühren mit 10,32 g (50 mMol) Dicyclohexylcarbodiimid und 7,66 g (50 mMol) N-Hydroxybenztriazol versetzt. Das Gemisch wird bei 0 °C 10 Minuten lang gerührt, dann wird das ausgeschiedene Dicyclohexylkarbamid abfiltriert.

12,74 g (50 mMol) H-Trp-OMe·HCl werden in 70 ml Dimethylformamid gelöst, und die Lösung wird auf 0 °C gekühlt. Man gibt 6,94 ml (50 mMol) Triäthylamin zu der Lösung und filtriert nach 5minütigem Rühren das ausgeschiedene Triäthylamin-hydrochlorid ab.

Die beiden Lösungen werden vereinigt und über Nacht bei 0 °C gerührt. Am anderen Tag wird das ausgeschiedene DCU abfiltriert und das Filtrat zur Trockne eingedampft. Das

zurückbleibende Öl wird in 500 ml Äthylacetat gelöst. Die Lösung wird zuerst mit 3×100 ml eiskalter 1 M KHSO₄-Lösung, dann mit 5×100 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und schliesslich mit 2×100 ml 10%iger NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und nach dem Filtrieren zur Trockne eingedampft. Der ölige Rückstand wird mit Petroläther verrieben, filtriert und dann getrocknet. Die erhaltene kristalline Substanz wurde in Äthylacetat gelöst und mit

10 Petroläther ausgefällt.

Ausbeute: 27,70 g (89%)

Schmp.: 119–122 °C

$[\alpha]_D^{25} = +14,1^\circ$ (c = 1, in Dimethylformamid)

$R_f^4 = 0,62$ $R_f^5 = 0,41$

15

b) H-His(DNP)-Trp-OMe·2HCl (M = 522,49 [freie Base] 595,41 [-2HCl])

24,9 g (40 mMol) des Dipeptids BOC-His(DNP)-Trp-OMe werden in 100 ml Methanol gelöst. Zu der Lösung werden 100 ml 4n methanolische Salzsäure gegeben. Das Gemisch wird bei Raumtemperatur 30 Minuten lang stehen gelassen. Das in dieser Zeit auskristallisierende Dipeptid-esterhydrochlorid wird abfiltriert, mit Äther gewaschen und dann getrocknet.

25

Ausbeute: 21,91 g (92%)

Schmp.: 198–202 °C

$[\alpha]_D^{25} = 0,49^\circ$ (c = 1, in Dimethylformamid)

$R_f^3 = 0,46$ $R_f^4 = 0,18$

30

c) Glp-His(DNP)-Trp-OMe (M = 633,60)

4,85 g (36,8 mMol) L-Pyroglutaminsäure, 7,58 g Dicyclohexylcarbodiimid und 5,63 g N-Hydroxybenztriazol werden in 100 ml Dimethylformamid gelöst. Das Gemisch wird bei 5–10 °C 10 Minuten lang gerührt und dann das ausgefallene DCU abfiltriert.

35

20,84 g (35 mMol) H-His(DNP)-Trp-OMe·2HCl werden in 100 ml Dimethylformamid gelöst und zu der Lösung 9,72 ml (70 mMol) Triäthylamin gegeben. Nach 5minütigem Rühren wird das ausgeschiedene Triäthylaminhydrochlorid abfiltriert. Die beiden Lösungen werden vereinigt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Am anderen Tag wird das Gemisch mit 90 ml Aceton versetzt, die sich ausscheidende unlösliche Substanz wird abfiltriert. Das Filtrat wird eingedampft. Das zurückbleibende Öl wird mit Äthylacetat verrieben und dann getrocknet. Die trockene kristalline Substanz wird mit 3×25 ml Wasser gewaschen und erneut getrocknet. Die Substanz kann durch kochendes Lösen in Äthylacetat und Abkühlen der Lösung umkristallisiert werden.

45

Ausbeute: 18,42 g (83,1%)

Schmp.: 148–151 °C

$[\alpha]_D^{25} = +5,2^\circ$ (c = 1, in Dimethylformamid)

$R_f^3 = 0,53$ $R_f^4 = 0,38$

50

d) Glp-His-Trp-OMe (M = 466,50)

15,84 g des geschützten Tripeptids Glp-His(DNP)-Trp-OMe werden in einem Gemisch aus 100 ml Dimethylformamid und 40 ml Wasser gelöst. Die Lösung wird mit 4 ml Mercaptoäthanol versetzt und dann mit Triäthylamin auf pH 8 gestellt. Das Gemisch wird bei Raumtemperatur 30 Minuten lang stehen gelassen und dann im Vakuum zur Trockne eingedampft. Der ölige Rückstand wird mit Äther verrieben, filtriert und getrocknet. Die erhaltene Substanz wird in wenig Methanol gelöst und durch Zusatz von Äther ausgefällt. Die Kristalle werden abfiltriert und getrocknet.

65

Ausbeute: 10,92 g (93,6%)

Schmp.: 228–232 °C

$[\alpha]_D^{25} = +4,04^\circ$ (c = 0,42, in Dimethylformamid)

$R_f^2 = 0,30$

e) Glp-His-Trp-N₂H₃ (M = 466,51)

9,33 g (20 mMol) des Tripeptids Glp-His-Trp-OMe werden in 250 ml Methanol gelöst und zu der Lösung 20 ml 98%iges Hydrazinhydrat gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 3 Stunden lang bei 40 °C, dann über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anderntags wird die ausgeschiedene Substanz abfiltriert, mit kaltem Methanol gewaschen und dann getrocknet.

Ausbeute: 7,58 g (81,2%)

Schmp.: 166–169 °C

$[\alpha]_D^{25} = -22,3^\circ$ (c = 0,5, in Dimethylformamid)

$R_f^1 = 0,50$ $R_f^2 = 0,14$

f) Glp-His-Trp-Ser-Tyr-OMe (M = 716,8)

7,0 g (15 mMol) Glp-His-Trp-N₂H₃ (Produkt des Schrittes e) werden in 60 ml Dimethylformamid gelöst. Die Lösung wird auf 0 °C gekühlt und unter Rühren mit 7,5 ml (45 mMol) 6n HCl versetzt. Dann tropft man langsam die gesättigte wässrige Lösung von 1,035 g (15 mMol) NaNO₂ zu dem Gemisch und rührt weitere 15 Minuten bei 0 °C. Dann versetzt man das Gemisch mit der Lösung von 4,78 g (15 mMol) H-Ser-Tyr-OMe·HCl in 15 ml Dimethylformamid und stellt den pH-Wert mit 6,25 ml (45 mMol) Triäthylamin auf neutral. Das Gemisch wird über Nacht bei 0–4 °C gerührt, anderntags im Vakuum zur Trockne eingedampft und der ölige Rückstand mit Äther verrieben.

Das Gewicht des pulverförmigen Produktes beträgt 12,1 g (100%). Das Chromatogramm zeigt Flecken von zwei geringfügigen Verunreinigungen, jedoch kann das Produkt ohne zwischenzeitliche Reinigung zum Hydrazid umgesetzt werden, welches gut kristallisiert. Physikalische Daten der zur Kontrolle aus Methanol umkristallisierten Substanz:

Schmp.: 188–190 °C

$[\alpha]_D^{25} = -3,48^\circ$ (c = 1, Dimethylformamid)

$R_f^1 = 0,58$ $R_f^2 = 0,26$

g) Glp-His-Trp-Ser-Tyr-N₂H₃ (M = 716,8)

12 g des rohen, pulverisierten Pentapeptidesters Glp-His-Trp-Ser-Tyr-OMe werden in 200 ml Methanol gelöst und zu der Lösung 10 ml 98%iges Hydrazinhydrat gegeben. Das Gemisch wird bei 40 °C drei Stunden lang und dann über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, die ausgefallenen Kristalle werden abfiltriert und im Exsikkator über konzentrierter Schwefelsäure getrocknet. Die getrocknete kristalline Substanz wird in 250 ml 0,5 n HCl gelöst, die Lösung mit konzentrierter Sodalösung auf pH 8 gestellt und bei 0 °C zwei Stunden lang stehengelassen. Die ausgefallenen Kristalle werden abfiltriert, mit eiskaltem Wasser gewaschen und dann getrocknet.

Ausbeute: 6,12 g (auf beide Schritte bezogen 56,9%)

Schmp.: 205–206 °C

$[\alpha]_D^{25} = -21,51^\circ$ (c = 1, Dimethylformamid)

$R_f^1 = 0,39$ $R_f^2 = 0,14$

Hydrazinstickstoff: berechnet: 3,91%, gefunden: 3,79%, 3,76%

h) Z-Gln-Pro-NHEt (M = 405,4)

3,242 g Prolinäthylamid (hergestellt aus 22,8 mMol Z-Pro-NHEt durch Hydrieren) werden in 70 ml Tetrahydrofuran gelöst und zu der Lösung 5,60 g (20 mMol) Z-Gln-OH und 1,034 g N-Hydroxybenzotriazol gegeben. Das Reaktionsgemisch wird auf dem Eisbad gekühlt und unter Rühren mit der Lösung von 5,34 g (25,9 mMol) Dicyclohexylcarbodiimid in 50 ml Tetrahydrofuran gegeben. Das Reaktionsgemisch wird auf dem Eisbad 5 Stunden lang, dann bei Raumtemperatur noch 20 Stunden lang gerührt, filtriert und das Filter mit Tetrahydrofuran nachgewaschen. Das Filtrat wird im Vakuum eingedampft und der Rückstand in Chloroform

gelöst. Die Lösung wird mit 3 × 35 ml mit der fünffachen Menge Wassers verdünntem Ammoniak, dann mit 2 × 20 ml Wasser, anschliessend mit 3 × 35 ml Salzsäure und schliesslich erneut mit 2 × 20 ml Wasser gewaschen. Dann wird die organische Phase über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Das Filter wird mit Chloroform nachgewaschen. Dann wird die Lösung zur Trockne eingedampft. Der ölige Rückstand wird in einem Gemisch aus 35 ml Tetrahydrofuran und 50 ml Äthylacetat gelöst und die Lösung filtriert. Nach Abdampfen des Lösungsmittels bleibt ein Öl zurück, das mit 100 ml Äther kristallisiert wird. Die feste Substanz wird auf dem Filter mit Äther gewaschen und dann im Vakuum getrocknet. Man erhält 7,68 g (95%) Produkt.

$R_f^1 = 0,45$ $R_f^2 = 0,73$

i) Z-Leu-Gln-Pro-NHEt (M = 518,57)

4,5 g (11 mMol) des geschützten Dipeptidamids Z-Gln-Pro-NHEt werden in 30 ml Eisessig gelöst. Zu der Lösung werden 55 ml 4n eisessigsäure Bromwasserstoffsäure gegeben. Das Reaktionsgemisch wird bei Raumtemperatur 1½ Stunden lang stehengelassen, dann mit 250 ml Äther versetzt und wieder eine Stunde stehengelassen. Die über dem Niederschlag stehende Flüssigkeit wird dekantiert, der Rückstand mit 100 ml Äther aufgeschlämmt, nach 15 Minuten abfiltriert und mit reichlich Äther gewaschen. Die hygroskopische feste Substanz wird im Vakuum über Phosphorpentoxid und Natriumhydroxyd getrocknet. Ausbeute: 4,9 g (hygroskopisch).

3,8 g (11 mMol) des erhaltenen Dipeptidäthylamidhydrobromids werden in 150 ml Chloroform suspendiert. Zu der Suspension werden 7,0 ml Triäthylamin gegeben. Dann wird das Reaktionsgemisch mit der Lösung von 6,4 g Z-Leu-pentachlorphenylester in 65 ml Chloroform versetzt und über Nacht gerührt. Anderntags wird das Reaktionsgemisch mit 1n Salzsäure, gesättigter Kochsalzlösung, 2n Ammoniak und schliesslich wieder mit gesättigter Kochsalzlösung extrahiert. Die organische Phase wird über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und dann im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wird mit Äther verrieben, die Festsubstanz abfiltriert, mit Äther gewaschen und dann im Vakuum getrocknet. Man erhält 4,6 g (81%) Rohprodukt.

j) GH-Leu-Gln-Pro-NHEt·HBr (M = 465,5)

Von dem auf die unter Punkt i) beschriebene Weise hergestellten Tripeptid Z-Leu-Gln-Pro-NHEt wird die Schutzgruppe ohne zwischenzeitliche Reinigung entfernt. Zu diesem Zweck wird das Produkt in 10 ml eisessigsäure Bromwasserstofflösung gelöst. Die Lösung wird bei Raumtemperatur eine Stunde lang gerührt und dann das Produkt durch Zusatz von 100 ml wasserfreiem Äther ausgefällt. Die Substanz wird abfiltriert und im Exsikkator getrocknet. Das Produkt ist ein gelbes hygroskopisches Pulver.

Ausbeute: 3,54 g (76%)

$R_f^1 = 0,42$ $R_f^2 = 0,13$ $R_f^3 = 0,55$ $R_f^4 = 0,1$

k) BOC-D-Phe-Leu-Gln-Pro-NHEt (M = 631,74)

2,33 g (5 mMol) des Tripeptidhydrochlorids H-Leu-Gln-Pro-NHEt·HBr werden in 5 ml Dimethylformamid gelöst. Die Lösung wird auf 0 °C gekühlt und zuerst mit 0,70 ml (0,5 mMol) Triäthylamin und dann mit der Lösung von 2,57 ml (5 mMol) BOC-D-Phe-pentachlorphenylester in 10 ml Dimethylformamid versetzt. Der pH-Wert der Lösung wird mit Trimethylamin auf einen Wert zwischen 7 und 8 gestellt. Das Gemisch wird bei Raumtemperatur 48 Stunden lang gerührt. Während dieser Zeit wird der pH-Wert mit Triäthylamin auf dem angegebenen Wert gehalten. Dann wird die Lösung im Vakuum eingedampft, der Rückstand wird in 100 ml Chloroform gelöst und die Lösung mit 10 × 10 ml

0,1 M Ammoniak gewaschen. Dann wird die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet, abfiltriert und eingedampft. Der ölige Rückstand kann durch Behandeln mit Äther in ein Pulver überführt werden. Das getrocknete Rohprodukt wiegt 2,81 g (89%). Die Schutzgruppe wird ohne weitere Reinigung entfernt.

l) H-D-Phe-Leu-Gln-Pro-NHEt·TFA (M = 645,65)

1,26 g (2 mMol) des Tetrapeptids BOC-D-Phe-Leu-Gln-Pro-NHEt werden in 10 ml Trifluoressigsäure gelöst. Die Lösung wird bei Raumtemperatur 20 Minuten lang gerührt. Die Trifluoressigsäure wird dann im Vakuum schnell entfernt. Der Rückstand wird an einer Silikagelsäule mit einem im Verhältnis 4:1:1 bereiteten Gemisch aus n-Butanol, Essigsäure und Wasser chromatographiert. Die Produktfraktionen werden gesammelt und im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wird in wenig Wasser gelöst und dann lyophilisiert.

Ausbeute: 880 mg (68%)

$R_f^1 = 0,25$ $R_f^2 = 0,35$

Schmp.: 142 °C; $[\alpha]_D^{20} = -66^\circ$ (c = 0,1, Dimethylformamid).

m) Glp-His-Trp-Ser-Ty-D-Phe-Leu-Gln-Pro-NHEt (M = 1199)

286 g (0,4 mMol) des gemäss Schritt g hergestellten Pentapeptidhydrazids Glp-His-Trp-Ser-Tyr-N₂H₃ werden in 10 ml Dimethylformamid gelöst. Die Lösung wird auf -10 °C gekühlt und unter Rühren mit 0,27 ml 6n Salzsäure und dann mit der gesättigten wässrigen Lösung von 30,2 mg NaNO₂ versetzt. Nach 5 Minuten gibt man die mit einem Gemisch aus 1 ml Dimethylformamid und 0,27 ml Triäthylamin bereitete und auf -10 °C gekühlte Lösung von 258 mg (0,4 mMol) H-D-Phe-Leu-Gln-Pro-NHEt·TFA zu dem Gemisch. Das Reaktionsgemisch wird eine Stunde lang bei -5 °C, dann eine weitere Stunde lang bei 0 °C gerührt, wobei der pH-Wert notwendigenfalls durch Zusatz von Triäthylamin auf einem neutralen Wert gehalten wird. Schliesslich lässt man die Temperatur auf Raumtemperatur ansteigen und dampft das Reaktionsgemisch im Vakuum ein.

Das nach dem Verdampfen erhaltene Öl wird in 5 ml 0,2n Essigsäure gelöst und an einer Säule aus Sephadex G25 (2 × 95 cm) mit 0,2n Essigsäure chromatographiert. Die entsprechenden Fraktionen werden gesammelt und lyophilisiert.

Ausbeute: 298 mg (62%)

$R_f^1 = 0,74$ $R_f^2 = 0,65$ $R_f^3 = 0,37$ $R_f^4 = 0,80$

Aminosäurenanalyse

Ser: 0,89 Pro: 0,97 Leu: 1,00 Phe: 0,99

Glu: 1,98 His: 1,01 Tyr: 1,03 Trp: 0,91

Beispiel 7

Trp⁷Gln⁸,desGly¹⁰-Gonadoliberinäthylamid (M = 1220)

a) BOC-Gln-Pro-NHEt (M = 370)

1,0 g (7 mMol) Prolinäthylamid wird in 15 ml Dimethylformamid gelöst. Der pH-Wert der Lösung wird mit Triäthylamin auf 8 eingestellt. Zu der Lösung wird die Lösung von 3,2 g (8,4 mMol) tert.-Butoxycarbonyl-glutaminyl-p-nitrophenylester in 15 ml Dimethylformamid gegeben. Das Reaktionsgemisch wird bei Raumtemperatur 48 Stunden lang gerührt. Während dieser Zeit wird der pH-Wert mit Triäthylamin bei 8 gehalten. Der nach dem Eindampfen des Reaktionsgemisches verbleibende ölige Rückstand wird in Wasser gelöst, die Lösung mit Äther gewaschen und die wässrige Phase im Vakuum eingedampft. Ausbeute: 1,93 g (74,5%)

$R_f^3 = 0,76$.

b) H-Gln-Pro-NHEt·TFA (M = 270 [freie Base], M = 367 [TFA-Salz])

1,9 g (7,2 mMol) BOC-Gln-Pro-NHEt werden in 10 ml

Trifluoressigsäure gelöst. Das Gemisch wird bei Raumtemperatur 20 Minuten lang gerührt und dann im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wird mit Äther verrieben, abfiltriert und im Vakuum getrocknet. Ausbeute: 1,52 g (58%).

$R_f^1 = 0,45$ $R_f^2 = 0,45$ $R_f^3 = 0,25$ $R_f^4 = 0,30$

Die Substanz ist hygroskopisch.

$[\alpha]_D^{20} = -34,8^\circ$ (c = 1, Methanol).

c) BOC-Trp-Gln-Pro-NHEt (M = 557)

500 mg (1,85 mMol) H-Gln-Pro-NHEt werden in 10 ml Dimethylformamid gelöst. Der pH-Wert wird mit Triäthylamin auf 8 eingestellt. Zu dem Reaktionsgemisch gibt man 608 g (2 mMol) tert.-Butoxycarbonyl-tryptophan in 10 ml Dimethylformamid und 620 µl (4 mMol) N,N'-Diisopropylcarbodiimid. Das Reaktionsgemisch wird bei Raumtemperatur 48 Stunden lang gerührt und dann im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wird in Äthylacetat gelöst und mit Äther ausgefällt. Das ausgefallene Produkt wird abfiltriert, mit Äther gewaschen und dann getrocknet.

Ausbeute: 740 mg (72%)

$R_f^2 = 0,75$ $R_f^3 = 0,38$

d) H-Trp-Gln-Pro-NHEt·TFA (M = 456,5 [freie Base], M = 554 [TFA-Salz])

700 mg (1,25 mMol) BOC-Trp-Gln-Pro-NHEt werden in 15 ml eines im Verhältnis 1:1 bereiteten Gemisches aus Trifluoressigsäure und Dichlormethan gelöst. Die Lösung wird bei Raumtemperatur 20 Minuten lang gerührt und anschliessend im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wird mit Äther verrieben, abfiltriert und getrocknet. Das Rohprodukt (500 mg) wird an einer Silikagelsäule mit einem im Verhältnis 47:20:6:11 bereiteten Gemisch aus Äthylacetat, Pyridin, Essigsäure und Wasser chromatographisch gereinigt. Die Produktfraktionen werden gesammelt und im Vakuum zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird mit Äther verrieben. Man erhält 360 mg (52%) eines weissen Pulvers.

$R_f^1 = 0,46$ $R_f^2 = 0,18$

Schmp.: 119–123 °C; $[\alpha]_D^{20} = -4,8^\circ$ (c = 0,1, 0,1n HCl)

e) BOC-Gly-Trp-Gln-Prop-NHEt (M = 613,7)

350 mg (0,76 mMol) H-Trp-Gln-Pro-NHEt werden in Dimethylformamid gelöst und mit 104 mg (0,8 mMol) BOC-Gly auf die im Schritt c) beschriebene Weise gekoppelt. Man erhält 375 mg (81%) einer kristallinen Substanz.

$R_f^3 = 0,88$ $R_f^4 = 0,82$ $R_f^5 = 0,61$

f) H-Gly-Trp-Gln-Pro-NHEt·TFA (M = 609,6)

375 mg (0,6 mMol) BOC-Gly-Trp-Gln-Pro-NHEt werden auf die im Schritt d) beschriebene Weise von der Schutzgruppe befreit und gereinigt. Man erhält 285 mg (76,6%) eines weissen Pulvers.

$R_f^2 = 0,08$ $R_f^3 = 0,16$ $R_f^4 = 0,67$ $R_f^5 = 0,28$

g) Glp-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Trp-Gln-Pro-NHEt (M = 1216,4)

286 g (0,4 mMol) des Pentapeptidhydrazids Glp-His-Trp-Ser-Tyr-N₂H₃ werden mit 243,8 mg (0,4 mMol) der gemäss Schritt m) des Beispiels 6 erhaltenen H-Gly-Trp-Gln-Pro-NHEt·TFA gekoppelt. Man erhält 252,9 mg (52%) Reinsubstanz.

$R_f^1 = 0,26$ $R_f^2 = 0,32$

Aminosäurenanalyse:

Ser: 0,87 Glu: 2,02 Pro: 0,91 Gly: 1,00

Tyr: 1,12 His: 1,05 Trp: 1,80

Beispiel 8

Bereitung von Injektionen für intramuskuläre, subkutane oder intravenöse Applikation.

a) Das Gonadoliberin-Derivat der allgemeinen Formel (I) wird in einer Konzentration von 1–10 mg/ml in destilliertem Wasser, physiologischer Kochsalzlösung oder gepufferter wässriger Lösung gelöst. Die Lösung wird sterilfiltriert und dann in 50–500 µg Wirkstoff enthaltenden Volumina in Ampullen gefüllt, lyophilisiert, und dann werden die Ampullen verschlossen.

Vor der Anwendung wird die in der Ampulle enthaltene Substanz in 1–10 ml destilliertem Wasser aufgelöst, und von

der Lösung wird eine der notwendigen Dosis entsprechende Menge injiziert.

b) Aus dem Gonadoliberin-Derivat der allgemeinen Formel (I) bereitet man mit einer 0,9% NaCl und 0,9% Benzylalkohol enthaltenden wässrigen Lösung eine Lösung der Konzentration von 20–500 µg/ml und füllt diese in Ampullen. Die Ampullen werden verschlossen. Die auf diese Weise hergestellten Präparate sind zur unmittelbaren Applikation geeignet.