

(19) **DANMARK**



(12) **FREMLÆGGELSESSKRIFT** (11) **149862 B**



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET

(61) Tillæg til patentnr: 148305

(21) Patentansøgning nr.: 0927/75

(51) Int.Cl.⁴: C 07 K 7/20

(22) Indleveringsdag: 07 mar 1975

(41) Alm. tilgængelig: 09 sep 1975

(44) Fremlagt: 13 okt 1986

(86) International ansøgning nr.: –

(30) Prioritet: 08 mar 1974 JP 27442/74

(71) Ansøger: *TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD.; Osaka, JP.

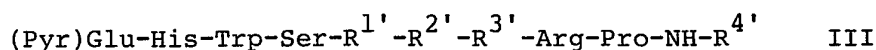
(72) Opfinder: Masahiko *Fujino; JP, Tsunehiko *Fukuda; JP, Susumu *Shinagawa; JP.

(74) Fuldmægtig: Kontor for Industriel Eneret

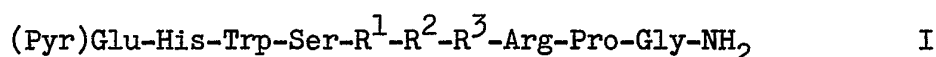
(54) Analogifremgangsmåde til fremstilling af
LH–RH–analoge dekaeptidamider eller et salt el-
ler et metalkompleks deraf

DK 149862 B

Den foreliggende opfindelse angår den ændring ved analogifremgangsmåden ifølge patent nr. 148.305 til fremstilling af et LH-RH-analogt nonapeptidamidderivat med den almene formel



hvor $\text{R}^{1'}$ er Tyr eller Phe, $\text{R}^{2'}$ er D-Leu, D-Ile, D-Nle, D-Val, D-Nva, D-Abu, α -Aibu, D-Phe, D-Phg, D-Ser, D-Thr eller D-Met, $\text{R}^{3'}$ er Leu, Ile eller Nle og $\text{R}^{4'}$ er en alkylgruppe med 1-3 kulstofatomer som kan være substitueret med en hydroxylgruppe, at der fremstilles et hidtil ukendt decapeptidamid med kraftig ovulationsfremkaldende virkning, og med den almene formel



hvor R^1 er Tyr eller Phe, R^2 er D-Nle, D-Nva, D-Abu, D-Phe, D-Ser, D-Thr eller D-Met og R^3 er Leu, Ile eller Nle eller et salt eller et metalkompleks deraf.

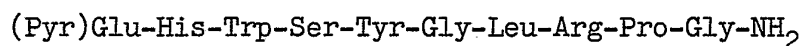
I nærværende beskrivelse og krav er aminosyrer, peptider og deres aktiverede karboxylgrupper eller beskyttelsesgrupper betegnet med forkortelser som er almindeligt anvendt inden for det særlige fagområde eller som er vedtaget af Committee in Biochemical Nomenclature of IUPAC-IUB. Aminosyrer er i L-konfiguration medmindre andet er angivet.

Der anvendes således følgende forkortelser:

Abu:	α -Aminosmørsyre
Arg:	Arginin
BOC:	t-Butoxykarbonyl
Bzl:	Benzyl
DCC:	N,N'-Dicyklohexylkarbodiimid
Gly:	Glycin
His:	Histidin
HONB:	N-Hydroxy-5-norbonen-2,3-dikarboximid
Ile:	Isoleucin
Leu:	Leucin
Nle:	Norleucin

Nva:	Norvalin
Met:	Metionin
OMe:	Metylester
OBzl:	Benzylester
ONB:	N-Hydroxy-5-norbonen-2,3-dikarboximidester
OSu	N-Hydroxysuccinimidester
Phe:	Fenylalanin
Pro:	Prolin
(Pyr)Glu:	Pyroglutaminsyre
Ser:	Serin
Thr:	Treonin
Tos:	Tosyl
Trp:	Tryptofan
Tyr:	Tyrosin

Det har været kendt i mange år at hypothalamus indeholder faktorer som på et højere niveau kontrollerer sekretionen af tropiske hormoner fra hypofysen. Efter isoleringen af et tyrotropin-stimulerende hormon (TRH) er der ekstraheret et hormon (LH-RH), som fremmer sekretionen af luteiniserende hormon, i ren form fra svin og får, og det har vist sig at være et dekaeptid med strukturen



(A.V. Schally et al, Biochem. Biophys. Res. Commun., 43, 1334 (1971), R. Guillemin et al, Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 69,278(1972)). Denne opdagelse er blevet fulgt af syntesen af et tilsvarende antal peptider og der har også været udført biologiske prøver på disse analoge peptider. Imidlertid formindsker selv en lille modifikation af den ovenfor viste aminosyresammensætning i alvorlig grad den fysiologiske virkning af peptidet og den ovenfor viste kemiske struktur har været anset som essentiel til frembringelse af maksimal fysiologisk virkning. (A.V. Schally et al, Biochem. Biophys. Res. Commun., 4, 366, 1972).

For nyligt har Monahan et al i "Biochemistry", bind 12, nr. 23, side 4616-4620, 1973, vist at blandt LH-RH-analogerne, såsom (Ala⁶)LH-RH, (D-Ala⁶)LH-RH, (Val⁶)LH-RH, (D-Val⁶)LH-RH, (Pro⁶)LH-RH og (D-Pro⁶)LH-RH som blev syntetiseret af dem, udviste (D-Ala⁶)LH-RH den stærkeste aktivitet på 350-450% af virkningen af det oprindelige LH-RH. Endvidere kendes fra dansk patentansøgning nr. 2250/73 LH-RH-analoge nonapeptid-amidderivater med en virkning på op til 672% af LH-RH's virkning. Det fremgår desuden af litteraturen at LH-RH-analoger, der i 6-stillingen har en D-aminosyre med en sidekæde der fylder mere end D-Ala, er mindre kraftige end det oprindelige hormon. Til trods for de ovennævnte angivelser er det lykkedes at syntetisere polypeptider med formel I, der i 6-stillingen har en D-aminosyre med sidekæder der fylder mere end D-Ala, og ved afprøvning af deres LH-RH-virkning har det overraskende vist sig at de ifølge opfindelsen fremstillede peptider med formel I er mindst 1000% kraftigere end det oprindelige LH-RH og således også mere virksomme end de fra dansk patentansøgning nr. 2250/73 kendte. Den foreliggende opfindelse bygger på disse uventede opdagelser.

Det er således formålet med den foreliggende opfindelse at tilvejebringe en analogifremgangsmåde til fremstilling af dekaeptidamidet med den almene formel I eller et salt eller et metalkompleks deraf.

Dekaeptidamidet med formel I fremstilles ifølge opfindelsen ved at et reagens A - L-pyroglutaminsyre eller et peptidfragment som indeholder fra 1 til 10 aminosyrer af den i formel I viste aminosyresekvens, regnet fra den N-terminale ende, og som har en L-pyroglutaminsyreenhed (dvs. (Pyr)Glu-) i sin N-terminale ende - kondenseres med et reagens B - en aminoforbindelse som svarer til den resterende del af det ovennævnte dekaeptidamid - hvilke reagenser A og B eventuelt er beskyttede, hvorefter man fjerner eventuelt tilstedeværende beskyttelsesgrupper og om ønsket omdanner det dannede produkt til et salt eller et metalkompleks deraf.

Således er reagens A L-pyroglutaminsyre eller et peptidfragment som har en L-pyroglutaminsyreenhed i sin N-terminale ende og som samtidigt regnet derfra omfatter en del af aminosyresekvensen med formel I, og reagenset B, som kondenseres med reagenset A, er en aminoforbindelse som svarer til den resterende del af dekaeptidamidet I, reagenserne A og B er eventuelt beskyttede.

De grundliggende kombinationer af reagens A og reagens B er eksemplificeret i følgende tabel 1.

Tabel 1

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

Kondensationsreaktionen ifølge den foreliggende opfindelse kan gennemføres ved kendte kondensationsmetoder for dannelse af peptidbindinger. Blandt sådanne kondensationsmetoder er DCC/HONB-processen (belgisk patentskrift nr. 796.399), azidprocessen, kloridprocessen, blandet syreanhydridprocessen, DCC-processen, aktiv esterprocessen, Woodward reagens K-processen, karbodiimidazolprocessen, oxydations-reaktionsprocessen og andre metoder (The Peptides, Vol 1, 1966, Schröder og Lubke, Academic Press, New York, USA).

Før kondensationsreaktionen kan man beskytte de karboxyl- og aminogrupeer der ikke skal involveres i den påtænkte reaktion eller man kan aktivere de karboxyl- og/eller de aminogrupeer der skal tage del i reaktionen på i og for sig kendt måde. Karboxylgrupperne i udgangsmaterialet kan beskyttes i form af metalsalte (fx natrium- og kaliumsalte) eller estere (fx metyl-, ætyl-, benzyl-, p-nitrobenzyl-, t-butyl- eller t-amylestere).

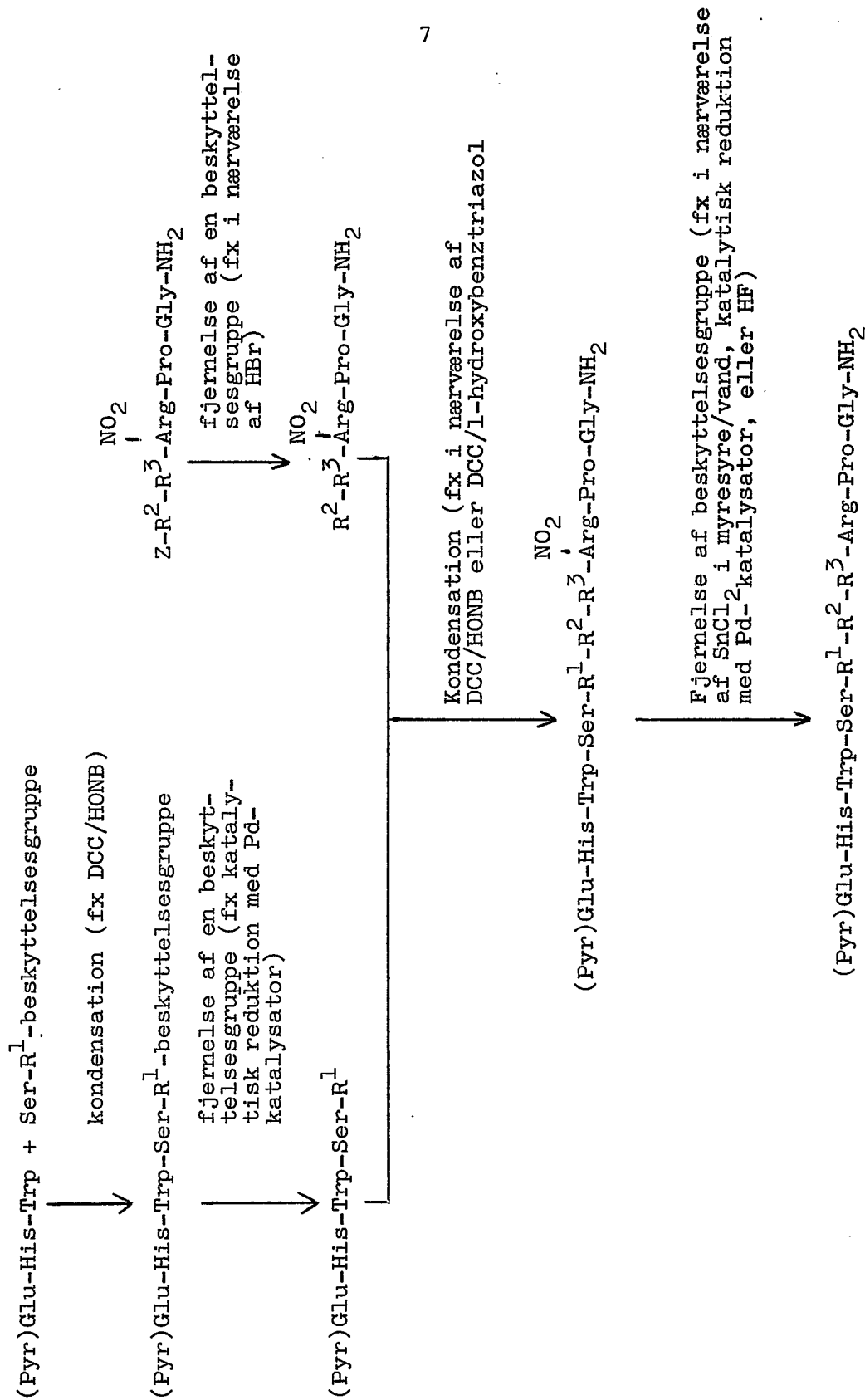
Beskyttelsesgrupper for aminogrupeer i udgangsmaterialerne kan være hvilke som helst konventionelle beskyttelsesgrupper for aminogrupeer ved peptidsyntese, fx benzyloxykarbonyl, t-butoxykarbonyl eller isobornyloxykarbonyl. Iminogruppen i histidin kan beskyttes med en hvilken som helst beskyttelsesgruppe såsom benzyl, tosyl, 2,4-dinitrofenol, t-butoxykarbonyl eller karbobenzoxo. Hydroxylgruppen i serin kan beskyttes med en konventionel beskyttelsesgruppe såsom benzyl, p-butyl eller andre æterdannende grupper. Hydroxylgruppen i tyrosin kan beskyttes med benzyl, t-butyl eller andre æterdannende grupper. Guanidingruppen i arginin kan beskyttes med sådanne grupper som nitro, tosyl, karbobenzoxo isobornyloxykarbonyl eller adamantyloxykarbonyl. Som eksempler på aktiverede karboxylgrupper i udgangsmaterialer kan nævnes det tilsvarende anhydrid, azid eller aktive estere (estere med alkoholer, fx pentaklorfenol, 2,4,5-triklorfenol, 2,4-dinitrofenol, cyanometylalkohol, p-nitrofenol, N-hydroxy-5-norbonen-2,3-dikarboximid, N-hydroxysuccinimid, N-hydroxyftalimid eller N-hydroxybenztriazol). De aktiverede aminogrupeer i udgangsmaterialer kan fx være tilsvarende fosforsyreamider.

Følgende tabel viser nogle eksempler på kombinationer af sådanne former af karboxyl- og aminogrupeer i materialerne A og B.

Tabel 2

Kombinations- eksempler	Udgangsmateriale			
	(A)		(B)	
	COOH	NH ₂	COOH	NH ₂
1 ^x	fri	beskyttet	beskyttet	fri
2	aktiveret	beskyttet	fri	fri
3	fri	beskyttet	beskyttet	aktiveret

NB: I tilfældet betegnet med x, er der fortrinsvis et dehydreringsmiddel til stede i reaktionssystemet (fx et karbodiimidreagens såsom dicyklohexylkarbodiimid). En praktisk udførelsesform for denne opfindelse kan skrives på følgende måde.



Denne reaktion kan gennemføres i nærværelse af et opløsningsmiddel. Opløsningsmidlet kan vælges fra dem der er kendt som anvendelige for peptidkondensationsreaktioner. Således kan der fx nævnes vandfrit eller vandigt dimetylformamid, dimetylsulfoxyd, pyridin, kloroform, dioxan, diklormetan, tetrahydrofuran og passende blandinger af sådanne opløsningsmidler.

Reaktionstemperaturen kan vælges indenfor det område der er kendt som anvendeligt til reaktioner der fører til dannelse af peptidbindinger, dvs. normalt indenfor området fra ca. -20°C til ca. 30°C. Desuden kan prekursormaterialerne (beskyttede peptider) for forbindelserne med formel I også let fremstilles ved synteseprocesser i fast fase.

Efter at den ønskede kondensationsreaktion er tilendebragt kan man fjerne beskyttelsesgrupper ved kendte metoder der som produktet bærer sådanne. Blandt sådanne kendte metoder er katalytisk reduktion i nærværelse af en katalysator såsom palladiumsort, palladium-på-kulstof, platin eller lignende, solvolyse ved hjælp af hydrogenfluorid, trifluoredikesyre eller lignende og reduktion med metallisk natrium i flydende ammoniak.

Det således vundne peptid med formel I kan udvindes fra reaktionsproduktblandingen ved metoder der er kendte fra udvinding af peptider, fx ved ekstraktion, fordelingskromatografi eller søjlekromatografi.

Den foreliggende reaktion kan gennemføres på i og for sig kendt måde i fast fase.

Peptidet med formel I kan også udvindes i form af et salt eller en metalkompleksforbindelse.

Som syrer der er istand til at danne salte med peptider med formel I kan nævnes uorganiske syrer såsom saltsyre, brombrintesyre, perklorisyre, salpetersyre, tiocyansyre, svovlsyre og fosforsyre samt organiske syrer såsom myresyre, eddikesyre, propionsyre, glykolsyre, mælkesyre, pyrodruesyre, oxalsyre, malonsyre, ravsyre, maleinsyre, fumarsyre, antranylsyre, kannelsyre, naftalensulfonsyre eller sulfanylsyre.

De metaller der er i stand til at danne metalkompleksforbindelser med peptidet med formel I indbefatter bl.a. zink, nikkel, kobolt og jern. En sådan metalkompleksforbindelse kan fremstilles på konventionel måde, fx ved at omsætte et peptid med

formel I med hydroxydet eller oxydet af et metal af den ovennævnte art ved pH ca. 6-8.

De ifølge opfindelsen fremstillede forbindelser med formel I har en LH-RH-(luteiniserende hormon-stimulerende hormon)-virkning og de er således i stand til at fremme sekretionen af LH (luteiniserende hormon) og FSH (follikel stimulerende hormon). Polypeptider med formel I er således nyttige som lægemidler til fremkaldelse af ovulationer hos kvinder og hundyr (fx rotter, får, svin, køer, hopper, vagtler eller høns). Peptiderne kan også anvendes til andre farmakologiske formål hvortil der har været anvendt konventionelle præparater af LH-RH, LH og FSH.

Idet LH-RH-virkningen af polypeptiderne med formel I er ca. 10-25 gange så stor som naturligt forekommende LH-RH kan den anvendte dosis ved hver indgift bestemmes på grundlag af det nævnte forhold mens man også tager andre faktorer i betragtning (fx det under behandling værende individ og arten af sygdommen). Fx kan en passende dosis vælges inden for området ca. 5 ng (nanogram) til 10 µg pr. dag pr. kg legemsvægt.

Polypeptiderne med formel I indgives først og fremmest ad ikke-oral vej (fx ved indsprøjtning eller ad rektal eller vaginal vej) selv om de indgives oralt i visse tilfælde.

Anvendelige dosisformer indbefatter fx injektionsblandinger, suppositorier, pessarer og pulvere. Injektionsblandingerne kan fremstilles ved at man opløser ca. 10 mikrogram til 500 mikrogram af et polypeptid med formel I i 1 ml fysiologisk saltopløsning. Polypeptiderne med formel I kan også tilberedes i form af frysetørrede ampulprodukter med mannitol tilsat som excipiens således at man kan indgive dem i form af på stedet fremstillede injektionsblandinger.

De peptidudgangsmaterialer der kan anvendes ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen kan fremstilles enten på kendt måde for peptidsyntese eller ved at anvende sådanne metoder som måtte være nødvendige.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen illustreres nærmere i det følgende ved hjælp af nogle eksempler.

I disse eksempler betegner følgende forkortelser Rf-værdien ved tyndlagskromatografi på silikagel med følgende opløsningsmiddelsystem.

Rf¹: kloroform/metanol/eddikesyre, 9:1:0,5

Rf²: ætylacetat/pyridin/eddikesyre/vand, 30:10:3:5

Rf³: n-butanol/ætylacetat/eddikesyre/vand, 1:1:1:1.

Eksempel 1

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

a) Z-(D)-Nva-Leu-Arg(NO₂)-Pro-Gly-NH₂

Til en opløsning af 380 mg Z-(D)-Nva-OH, 690 mg H-Leu-Arg(NO₂)-Pro-Gly-NH₂ og 300 mg HONB i 5 ml dimetylformamid sættes 340 mg DCC ved 0°C under omrøring. Blandingen omrøres i 2 timer ved 0°C og i yderligere 10 timer ved stuetemperatur. Reaktionsblandingen filtreres til fjernelse af det dannede dicyklohexylurinstof og filtratet inddampes til tørhed. Den resulterende remanens opløses i 100 ml kloroform og opløsningen vaskes med 4% vandigt natriumbikarbonatopløsning og vand. Den vaskede opløsning tørres over vandfrit magnesiumsulfat og inddampes til tørhed. Derefter tritureres remanensen med en blanding af 25 ml ætylacetat og 25 ml æter hvorved der vindes et hvidt pulver som opsamles ved filtrering og genudfældes fra ætanol/æter: udbytte 1,12 g, $\alpha_D^{23} = -50,5^\circ$ (c = 1,1 i metanol), $R_f^1 = 0,32$.

Beregnet for C₃₂H₅₂O₉N₁₀:

	C 53,32,	H 7,27,	N 19,43
Fundet:	C 53,49,	H 7,56,	N 19,19%.

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

1,0 g Z-(D)-Nva-Leu-Arg(NO₂)-Pro-Gly-NH₂ opløses i 10 ml 25% hydrogenbromid i eddikesyre og opløsningen omrøres i 50 minutter. Reaktionsblandingen fortyndes med 200 ml tør æter hvilket giver et bundfald som opsamles ved filtrering og vaskes grundigt med tør æter. Det opsamlede pulver tørres over natriumhydroxyd under nedsat tryk. Dette pulver opløses i 10 ml dimetylformamid sammen med 1,0 g (Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Phe-OH og 440 mg HONB. Opløsningen afkøles til 0°C og der tilsættes 400 mg DCC under omrøring. Blandingen omrøres i 6 timer ved 0°C og i yderligere 16 timer ved stuetemperatur. Reaktionsblandingen filtre-

res til fjernelse af det dannede dicyklohexylurinstof og filtratet tritureres ved tilsætning af 100 ml æter hvorved der vindes et bundfald som opsamles ved filtrering. Det opsamlede bundfald opløses i 10% vandigt ætanol og opløsningen anbringes på en kolonne af polystyrenharpiks ("Amberlite" XAD-2 (150-250 mesh, 35 x 25 cm) "Amberlite" er et i Danmark indregistreret varemærke) og kolonnen elueres ved gradientmetoden med 10% vandigt ætanol og 100% ætanol (500:550 ml). Hovedfraktionen (380-220 ml) opsamles og inddampes til tørhed. Remanensen opløses i 5 ml varm metanol og genudfældes ved tilsætning af ætylacetat hvorved man vinder det beskyttede dekaeptidamid. 1,41 g, $\alpha_D^{24} = -35,4^\circ$ (c = 0,12 i metanol, $Rf^2 = 0,20$, $Rf^3 = 0,56$).

500 mg af det beskyttede dekaeptidamid opløstes i 5 ml vandfrit hydrogenfluorid sammen med 0,5 ml anisol ved -70°C . Efter at have været ^{i 30 minutter} omrørt ved -5°C fjernedes hydrogenfluoridet ved inddampning. Den resulterende remanens opløses i 20 ml vand og opløsningen ekstraheres to gange med 10 ml ætylacetat. Det vandige lag påføres en kolonne af karboxymetylcellulose (2 x 35 cm) og kolonnen elueres ved gradientelueringsmetoden under anvendelse af en ammoniumacetatpuffer som elueringsmiddel (0,05M, pH 6,8 (500 ml) - 0,2M, pH 6,8 (500 ml)). Hovedfraktionen (420 ml - 680 ml) opsamles og frysetørres hvorved der vindes et hvidt pulver i et udbytte på 380 mg, $\alpha_D^{22} = -32,4^\circ$ (c = 0,52 i 5% eddikesyre), $Rf^2 = 0,05$, $Rf^3 = 0,68$.

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

Eksempel 2

(Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-(D)-Nle-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ ved fast fase-metode

a) BOC-Gly-harpiks

I 60 ml kloroform/ætanol (2:1) anbringes 10 g klor-metyl-harpiks (Cl-indhold 2,0 mmol/g) hvorefter der tilsættes 10,5 g BOC-Gly og 8,4 ml triætylamin. Blandingen omrøres ved

stuetemperatur i 1 1/2 time og opvarmes derpå i 24 timer. Harpiksen opsamles ved filtrering og vaskes grundigt med dimetylformamid og yderligere med ætanol, vand, ætanol og æter i den nævnte rækkefølge hvorefter den tørres. Udbytte 17,55 g. Aminosyreanalyse viser at denne harpiks indeholder 0,88 mmol/g BOC-Gly.

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

Reaktionsbeholderen til et automatisk peptidsynteseapparat (model "APS-800" ^(R), Simadzu Seisakusho, Japan) fyldes med 2,177 g af den i eksempel 2 a) vundne BOC-Gly-harpiks og harpiksen kvældes med diklormetan i 12 timer. Derpå tilføres følgende aminosyrer i den følgende cyklus.

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

Diklormetan (3 minutter x 3) → 50% trifluoredikesyre/diklormetan (10 minutter og 30 minutter) → diklormetan (3 minutter x 3) → ætanol (3 minutter x 3) → diklormetan (3 minutter x 3) → 10% triætylamin/kloroform (10 minutter) → kloroform (3 minutter x 3) → diklormetan (3 minutter x 2) → BOC-aminosyreanhydrid (syntetiseret fra BOC-aminosyre og DCC på konventionel måde) (30 minutter og 60 minutter) → acylering (med eddikesyreanhydrid i diklormetan og triætylamin) (1 time) → diklormetan (3 minutter x 3) / kun (Pyr)Glu kondenseres direkte med DCC i dimetylformamid⁷.

Til sidst vaskes harpiksen med ætanol, kloroform og dimetylformamid. Derpå vaskes den med æter og tørres. Udbytte 6,20 g.

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

I 50 ml ammoniakmættet metanol suspenderes 2,622 g af den i eksempel 2 b) fremstillede harpiks og suspensionen omrøres ved stuetemperatur i 70 timer.

Harpiksen opsamles ved filtrering og vaskes med dimetylformamid. Filtratet og vaskevæskerne forenes, koncentrerer til tørhed under nedsat tryk og behandles med æter. Proceduren giver 1,187 g af et råt pulver.

En portion på 588 mg af dette produkt renses på en tør kolonne af 50 g silikagel under anvendelse af en opløsningsmiddelblanding af metanol og kloroform som fremkalder, hvorved der vindes 186 mg af det ønskede produkt.

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

I nærværelse af 0,2 ml anisol og 0,2 ml merkapto-ætanol opløses 173,3 mg af det i eksempel 2 c) vundne beskyttede peptid i 5 ml tørt hydrogenfluorid og opløsningen omrøres ved 0°C i en time. Derpå koncentrerer den til tørhed under nedsat tryk og koncentratet opløses i 20 ml vand. De uopløselige bestanddele filtreres fra og filtratet føres gennem en kolonne (1,5 cm i diameter x 20 cm) af en stærk basisk anionbytterharpiks ("Amberlite" IRA-410 acetatform). Derpå renses effluenten ved hjælp af karboxymetylcellulose (1,5 x 22 cm, gradientelueringssmetode under anvendelse af 0,005M til 0,2M ammoniumacetat med pH 6,8) og polystyrenharpiks "Amberlite" XAD-2, 1,5 x 7,5 cm, gradienteluering under anvendelse af 5% - 70% vandigt ætanol). Eluatet underkastes yderligere gelfiltreringskromatografi på "Sephadex" LH-20 (0,9 x 53,5 cm, 0,1N eddikesyre) ("Sephadex" er et i Danmark indregistreret varemærke). Proceduren giver 39 mg af den ønskede forbindelse med $\alpha_D^{24} = -40,5^\circ$ (c = 0,5 i 5% vandigt eddikesyre).

Aminosyreanalyse (sur hydrolyse i nærværelse af tioglykolsyre)
 Glu 0,97; His 0,97; Trp 0,94; Ser 0,88; Tyr 1,0; Leu 1,00;
 Nle 1,06; Arg 1,03; Pro 1,00; Gly 1,03; (87% genvinding).

Eksempel 3 - 13

Ved anvendelse af procedurer svarende til den i eksempel 2 beskrevne med den undtagelse af at der anvendes de udgangsmaterialer der er angivet i følgende tabel i stedet for dem der anvendes i eksempel 2 fremstilles de i tabellen angivne decapeptidamider med formel I.

T a b e l

Eksem- pel	Dekapeptidamid (I)			$\alpha_D^{24}(c=0,5)$ i 5% s van- digt eddike- syre	Aminosyreanalyse	Udgangsmaterialer anvendt i stedet for dem i eksempel 2		
	R ¹	R ²	R ³			BOC-Tyr(Bzl)	BOC-D-Nle	BOC-Leu
3	Tyr	D-Ser	Leu	-44,8°	His 1,02; Arg 1,01; Trp 0,97; Ser 1,91; Glu 1,00; Pro 1,01; Gly 1,03; Leu 0,97; Tyr 0,96	BOC-Tyr(Bzl)	BOC-D-Ser (Bzl)	BOC-Leu
4	Tyr	D-Abu	Leu	-43,2°	His 0,96; Arg 1,00; Trp 0,89; Ser 0,92; Glu 1,00; Pro 1,00; Gly 0,99; Abu 0,97; Leu 1,00; Tyr 0,98	BOC-Tyr(Bzl)	BOC-D-Abu	BOC-Leu
5	Tyr	D-Nva	Leu	-38,9°	His 1,00; Arg 0,99; Trp 0,92; Ser 0,91; Glu 1,00; Pro 1,00; Gly 1,01; Nva 0,97; Leu 0,98; Tyr 0,98	BOC-Tyr(Bzl)	BOC-D-Nva	BOC-Leu
6	Tyr	D-Thr	Leu	-37,5°	His 1,01; Arg 0,98; Trp 0,95; Thr 1,00; Ser 0,92; Glu 1,00; Pro 1,00; Gly 0,99; Leu 1,00; Tyr 0,98	BOC-Tyr(Bzl)	BOC-D-Thr	BOC-Leu

Eksempel	Dekapeptidamid (I)			$\alpha_D^{24}(c=0,5)$ i 5% vandigt eddikesyre	Aminosyreanalyse	Udgangsmaterialer anvendt i stedet for dem i eksempel 2		
	R ¹	R ²	R ³			BOC-Tyr(Bzl)	BOC-D-Nle	BOC-Leu
7	Tyr	D-Phe	Leu	-52,4°	His 1,00; Arg 0,99; Trp 0,87; Ser 0,89; Glu 1,00; Pro 0,99; Gly 1,01; Leu 0,98; Phe 1,00; Tyr 0,96	BOC-Tyr(Bzl)	BOC-D-Phe	BOC-Leu
8	Tyr	D-Met	Leu	-42,0°	His 0,98; Arg 1,00; Trp 0,89; Ser 0,92; Glu 0,99; Pro 0,98; Gly 1,00; Met 0,79; Leu 1,00; Tyr 1,00	BOC-Tyr(Bzl)	BOC-D-Met	BOC-Leu
9	Phe	D-Phe	Leu	-69,5°	His 1,00; Arg 0,98; Trp 0,87; Ser 0,98; Glu 1,01; Pro 0,98; Gly 1,00; Leu 1,00; Phe 1,98	BOC-Phe	BOC-D-Phe	BOC-Leu
10	Tyr	D-Abu	Ile	-38,5°	His 1,00; Arg 1,00; Trp 0,92; Ser 0,88; Glu 1,03; Pro 1,00; Gly 1,00; Abu 0,96; Ile 0,98; Tyr 0,98	BOC-Tyr(Bzl)	BOC-D-Abu	BOC-Ile

Eksempel	Dekapeptidamid (I)			$\alpha_D^{24}(c=0,5)$ i 5% vandigt eddikesyre	Aminosyreanalyse	Udgangsmaterialer anvendt i stedet for dem i eksempel 2		
	R ¹	R ²	R ³			BOC-Tyr(Bzl)	BOC-D-Nle	BOC-Leu
11	Phe	D-Ser	Nle	-32,5°	His 0,96; Arg 0,94; Trp 0,87; Ser 1,87; Glu 1,00; Pro 0,99; Gly 1,00; Nle 0,96; Phe 1,02	BOC-Phe	BOC-D-Ser (Bzl)	BOC-Nle
12	Phe	D-Nle	Nle	-35,1°	His 1,00; Arg 1,01; Trp 0,81; Ser 0,89; Glu 1,02; Pro 1,00; Gly 1,00; Nle 2,03; Phe 0,97	BOC-Phe	BOC-D-Nle	BOC-Nle
13	Phe	D-Nva	Ile	-35,5°	His 0,96; Arg 1,00; Trp 0,86; Ser 0,89; Glu 1,00; Pro 1,00; Gly 0,98; Nva 0,90; Ile 0,92; Phe 0,99	BOC-Phe	BOC-D-Nva	BOC-Ile

Biologisk forsøgsrapport

Der er foretaget en bestemmelse af de omhandlede forbindelsers ovulationsfremkaldende virkning ved anvendelse af den metode, der er beskrevet i J.Med.Chem. 16, 1144-1147 (1973). Til sammenligning bestemtes virkningen af forbindelser kendt fra dansk patentansøgning nr. 2250/73 og fra Monahan et al, Biochemistry, bind 12, nr. 23, side 4616-4620 (1973). Som reference sammenlignedes der med virkningen (=100%) af LH-RH = (Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂.

Resultaterne fremgår af følgende tabel:

(Pyr)Glu-His-Trp-Ser-R ¹ -R ² -R ³ -Arg-Pro-Gly-NH ₂			
R ¹	R ²	R ³	Ovulationsfremkaldende virkning (%) (LH-RH = 100)
Phe	D -Nva	Leu	1800
Tyr	D -Nle	Leu	2200
Tyr	D -Ser	Leu	2700
Tyr	D -Abu	Leu	2500
Tyr	D -Nva	Leu	2500
Tyr	D -Thr	Leu	2400
Tyr	D -Phe	Leu	2800
Tyr	D -Met	Leu	2500
Phe	D -Phe	Leu	2000
Tyr	D -Abu	Ile	1200
*(Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-NH-CH ₂ -CH ₃			672
**(D-Ala ⁶)-LH-RH			350-450

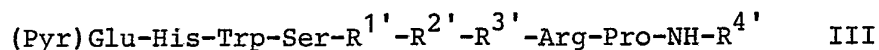
* forbindelse kendt fra dansk patentansøgning nr 2250/73.

** forbindelse kendt fra Monahan et al.

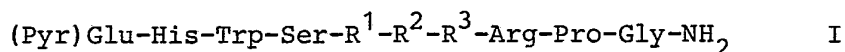
ED₅₀ for LH-RH er 215 ± 12 ng/100 g legemsvægt (rotte).

P a t e n t k r a v

Ved analogifremgangsmåde ifølge patent nr. 148.305 til fremstilling af et LH-RH-analogt nonapeptidamidderivat med den almene formel



hvor R^1 er Tyr eller Phe, R^2 er D-Leu, D-Ile, D-Nle, D-Val, D-Nva, D-Abu, α -Aibu, D-Phe, D-Phg, D-Ser, D-Thr eller D-Met, R^3 er Leu, Ile eller Nle og R^4 er en alkylgruppe med 1-3 kulstofatomer som kan være substitueret med en hydroxylgruppe, den ændring, at man fremstiller et dekaeptidamid med den almene formel



hvor R^1 er Tyr eller Phe, R^2 er D-Nle, D-Nva, D-Abu, D-Phe, D-Ser, D-Thr eller D-Met og R^3 er Leu, Ile eller Nle, eller et salt eller et metalkompleks deraf, ved at man kondenserer et reagens A - L-pyroglutaminsyre eller et peptidfragment som indeholder fra 1 til 10 aminosyrer af den i formel I viste aminosyresekvens, regnet fra den N-terminale ende, og som har en L-pyroglutaminsyreenhed (dvs. (Pyr)Glu-) i sin N-terminale ende - med et reagens B - en aminoforbinde som svarer til den resterende del af det ovennævnte dekaeptidamid - hvilke reagenser A og B eventuelt er beskyttede, hvorefter man fjerner eventuelt tilstedeværende beskyttelsesgrupper og om ønsket omdanner det dannede produkt til et salt eller et metalkompleks deraf.

Fremdragne publikationer:

DK ansøgning nr. 2250/73 (patent nr. 147851).
Biochemistry, bind 12, nr. 23 (1973), side 4616-4620.