



## PATENTANSPRÜCHE

## 1. Gonadoliberin-Derivate der allgemeinen Formel (I)

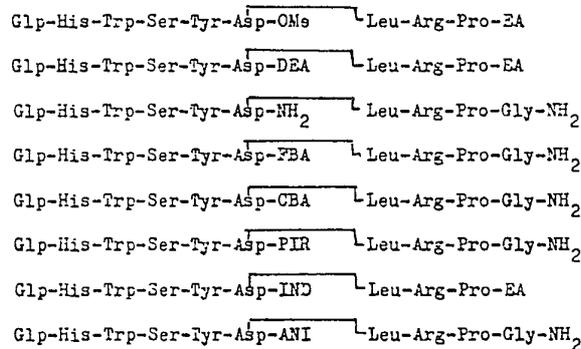


worin der Asparaginsäurerest über seine  $\beta$ -Carboxygruppe in die Peptidkette eingebaut ist, und

X für den Rest FBA oder eine Gruppe der allgemeinen Formel  $-O-R$  steht, in der die Bedeutung von R Benzylgruppe, Alkylgruppe mit 1-4 Kohlenstoffatomen oder X für eine Gruppierung  $-NR_1R_2$  steht und in letzterer  $R_1$  und  $R_2$  unabhängig voneinander für Wasserstoff, eine  $C_{1-5}$ -Alkyl-, eine Aryl-, Aryl- $C_{1-2}$ -alkyl- oder eine Cyclobutylgruppe stehen oder gemeinsam zusammen mit dem benachbarten Stickstoffatom eine Morpholino-, 1-Indoliny- oder 1-Pyrrolidinygruppe bilden, und

Y für eine Glycinamid- oder für eine Alkylamidgruppe mit 1-4 Kohlenstoffatomen steht, sowie die Säureadditionssalze dieser Verbindungen.

## 2. Eine Verbindung, ausgewählt unter



und ihren Säureadditionssalzen als Verbindung nach Anspruch 1.

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

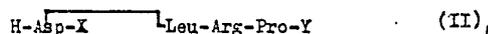


worin der Asparaginsäurerest über seine  $\beta$ -Carboxygruppe in die Peptidkette eingebaut ist, und

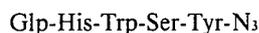
X für den Rest FBA oder eine Gruppe der allgemeinen Formel  $-O-R$  steht, in der die Bedeutung von R Benzylgruppe, Alkylgruppe mit 1-4 Kohlenstoffatomen oder eine Gruppierung  $-NR_1R_2$  ist und in letzterer  $R_1$  und  $R_2$  unabhängig voneinander für Wasserstoff, eine  $C_{1-5}$ -Alkyl-, Aryl-, Aryl- $C_{1-2}$ -alkylgruppe oder eine Cyclobutylgruppe stehen oder gemeinsam zusammen mit dem benachbarten Stickstoffatom eine Morpholino-, 1-Indoliny- oder 1-Pyrrolidinygruppe bilden und

Y für eine Glycinamid- oder für eine Alkylamidgruppe mit 1-4 Kohlenstoffatomen steht, sowie der Säureadditionssalze dieser Verbindungen, dadurch gekennzeichnet, dass man

## a) ein Tetra- oder Pentapeptid der allgemeinen Formel (II)

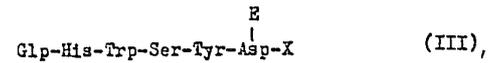


worin die Bedeutung von X und Y die gleiche wie oben ist, mit dem Pentapeptidazid der Formel



kondensiert, oder

## a) ein Hexapeptid der allgemeinen Formel (III)



worin die Bedeutung von X die gleiche wie oben ist und E für Hydroxyl-, Azido- oder N-Succinimidoxygruppe oder für gegebenenfalls durch Nitrogruppe oder durch Halogen substituierte Phenoxygruppe steht, mit einem Tri- oder Tetrapeptid der allgemeinen Formel (IV)



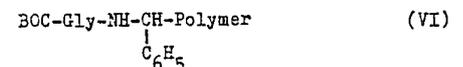
worin die Bedeutung von Y die gleiche wie oben ist, kondensiert, oder

a) zur Herstellung von Verbindungen der allgemeinen Formel (I), die am C-Terminal des Moleküls eine Glycinamidgruppe enthalten, BOC-Glycin an 1-3% Querbindungen enthaltendes, chlormethyliertes Polystyrol-Divinylbenzol-Harz koppelt, von der erhaltenen Verbindung der Formel (V)



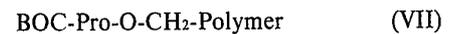
die BOC-Gruppe abspaltet und dann vom C-Terminal ausgehend durch periodische Wiederholung der Abspalt- und Kopplungsreaktionen geschützte Aminosäuren in der entsprechenden Reihenfolge an das Peptidpolymer koppelt und das fertige Peptid vom Polymer sowie die Schutzgruppen vom Peptid durch Ammonolyse und anschließende Behandlung mit Fluorwasserstoff abspaltet, oder

a) zur Herstellung von Verbindungen der allgemeinen Formel (I), die am C-Terminal des Moleküls eine Glycinamidgruppe enthalten, BOC-Glycin an Benzhydrylaminogruppen und 1-3% Querbindungen enthaltendes Polystyrol-Divinylbenzol-Harz koppelt und von der auf diese Weise erhaltenen Verbindung der Formel (VI)



die BOC-Gruppe abspaltet und dann vom C-Terminal ausgehend durch periodische Wiederholung der Abspalt- und Kopplungsreaktionen geschützte Aminosäuren in der entsprechenden Reihenfolge an das Peptidpolymer koppelt und das fertige Peptid vom Polymer sowie die Schutzgruppen vom Peptid mittels Fluorwasserstoff abspaltet, oder

a) zur Herstellung von Verbindungen der allgemeinen Formel (I), die am C-Terminal des Moleküls eine Gruppe  $-Pro-Y$  enthalten, worin die Bedeutung von Y die gleiche wie oben ist, BOC-Prolin an 1-3% Querbindungen enthaltendes, chlormethyliertes Polystyrol-Divinylbenzol-Harz koppelt, von der auf diese Weise erhaltenen Verbindung der Formel (VII)



die BOC-Gruppe abspaltet, dann vom C-Terminal ausgehend durch periodische Wiederholung der Abspalt- und Kopplungsreaktionen geschützte Aminosäuren in der entsprechenden Reihenfolge an das Peptidpolymer koppelt und das fertige Peptid vom Polymer durch Aminolyse, die Schutzgruppen vom Peptid mit Fluorwasserstoff abspaltet.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass man im Schritt a) eine Verbindung der Formel III verwendet, in der E für eine p-Nitro-, 2,4,6-Trichlor-, Pentachlor- oder Pentafluorphenoxygruppe steht.

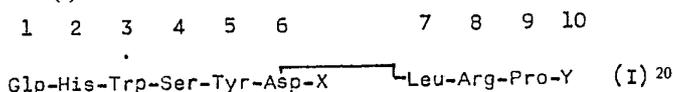
5. Arzneimittelpräparate, gekennzeichnet durch einen Gehalt an Gonadoliberin-Derivaten der allgemeinen Formel

(I) gemäss Anspruch 1 oder ihren Säureadditionssalzen.

6. Verfahren zur Herstellung von Arzneimittelpräparaten gemäss Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass man Gonadoliberin-Derivate der allgemeinen Formel (I), worin die Bedeutung von X und Y die gleiche wie in Anspruch 1 ist, durch Vermischen mit Träger-, Streck- und Hilfsstoffen zu Arzneimittelpräparaten formuliert.

### BESCHREIBUNG

Die Erfindung betrifft neue Gonadoliberin-Derivate, die eine  $\beta$ -Aspartylgruppe enthalten. Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung dieser Verbindungen und die diese Verbindungen enthaltenden Arzneimittelpräparate. Die neuen Verbindungen entsprechen der allgemeinen Formel (I)



worin der Asparaginsäurerest über seine  $\beta$ -Carboxygruppe in die Peptidkette eingebaut ist, und

X für den Rest FBA oder eine Gruppe der allgemeinen Formel  $-O-R$  steht, in der die Bedeutung von R Benzylgruppe, Alkylgruppe mit 1-4 Kohlenstoffatomen oder X für eine Gruppierung  $-NR_1R_2$  steht und in letzterer  $R_1$  und  $R_2$  unabhängig voneinander für Wasserstoff, eine  $C_{1-5}$ -Alkyl-, eine Aryl-, Aryl- $C_{1-2}$ -alkyl- oder eine Cyclobutylgruppe stehen oder gemeinsam zusammen mit dem benachbarten Stickstoffatom eine Morpholino-, 1-Indoliny- oder 1-Pyrrolidinygruppe bilden, und

Y für eine Glycinamid- oder für eine Alkylamidgruppe mit 1-4 Kohlenstoffatomen steht.

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

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

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

Gonadoliberin-Derivate nur über eine minimale Aktivität verfügen.

Zum Freisetzen von LH erwies sich nur eine Verbindung mit L-Konfiguration als biologisch wirksamer Substituent in 6-Stellung geeignet, und zwar ein spezieller L- $\gamma$ -Lactamring (Veber u.a., Science 210, 665 [1980]).

Ziel der Erfindung ist die Bereitstellung neuer Gonadoliberin-Derivate, die eine vorteilhaftere Wirkung haben als die bekannten Analogen.

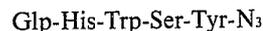
Die Erfindung beruht auf der Erkenntnis, dass die biologische Wirkung der in 6-Stellung eine D-Aminosäure enthaltenden Gonadoliberin-Derivate erreicht oder übertroffen werden kann von Verbindungen, in denen die L-Asparaginsäure über ihre  $\beta$ -Carboxylgruppe in die 6-Stellung der Peptidkette des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

Die Verbindungen der allgemeinen Formel (I) werden hergestellt, indem man

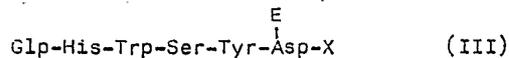
a<sub>1</sub>) ein Tetra- oder Pentapeptid der allgemeinen Formel (II)



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



kondensiert oder  
a<sub>2</sub>) ein Hexapeptid der allgemeinen Formel (III)

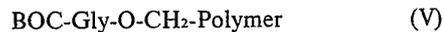


worin die Bedeutung von X die gleiche wie oben ist und E für Hydroxyl-, Azido- oder N-Succinimidoxygruppe oder für gegebenenfalls durch Nitrogruppe oder durch Halogen substituierte Phenoxygruppe, vorzugsweise für p-Nitro-, 2,4,6-Trichlor-, Pentachlor- oder Pentafluorphenoxygruppe, steht, mit einem Tri- oder Tetrapeptid der allgemeinen Formel (IV)



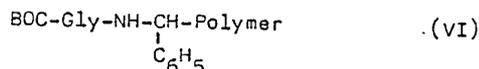
worin die Bedeutung von Y die gleiche wie oben ist, kondensiert, oder

a<sub>3</sub>) zur Herstellung von Verbindungen der allgemeinen Formel (I), die am C-Terminal des Moleküls eine Glycinamidgruppe enthalten, BOC-Glycin an 1-3%, vorzugsweise 2%, Querverbindungen enthaltendes, chlormethyliertes Polystyrol-Divinylbenzol-Harz koppelt, von der erhaltenen Verbindung der Formel (V)



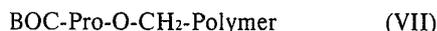
die BOC-Gruppe abspaltet und dann vom C-Terminal ausgehend durch periodische Wiederholung der Abspalt- und Kopplungsreaktionen geschützte Aminosäuren in der entsprechenden Reihenfolge an das Peptidpolymer koppelt und das fertige Peptid vom Polymer sowie die Schutzgruppen vom Peptid durch Ammonolyse und anschliessende Behandlung mit Fluorwasserstoff abspaltet, oder

a<sub>4</sub>) zur Herstellung von Verbindungen der allgemeinen Formel (I), die am C-Terminal des Moleküls eine Glycinamidgruppe enthalten, BOC-Glycin an Benzhydrylamino- und 1-3%, vorzugsweise 2%, Querverbindungen enthaltendes Polystyrol-Divinylbenzol-Harz koppelt und von der auf diese Weise erhaltenen Verbindung der Formel (VI)



die BOC-Gruppe abspaltet und dann vom C-Terminal ausgehend durch periodische Wiederholung der Abspalt- und Kopplungsreaktionen geschützte Aminosäuren in der entsprechenden Reihenfolge an das Peptidpolymer koppelt und das fertige Peptid vom Polymer sowie die Schutzgruppen vom Peptid mittels Fluorwasserstoff abspaltet, oder

a) zur Herstellung von Verbindungen der allgemeinen Formel (I), die am C-Terminal des Moleküls eine Gruppe -Pro-Y enthalten, worin die Bedeutung von Y die gleiche wie oben ist, BOC-Prolin an 1-3%, vorzugsweise 2%, Querbindungen enthaltendes, chlormethyliertes Polystyrol-Divinylbenzol-Harz koppelt, von der auf diese Weise erhaltenen Verbindung der Formel (VII)



die BOC-Gruppe abspaltet, dann vom C-Terminal ausgehend durch periodische Wiederholung der Abspalt- und Kopplungsreaktionen geschützte Aminosäuren in der entsprechenden Reihenfolge an das Peptidpolymer koppelt und das fertige Peptid vom Polymer durch Aminolyse, die Schutzgruppen vom Peptid mit Fluorwasserstoff abspaltet.

Das für das Verfahren a) als Ausgangsstoff erforderliche Tetra- oder Pentapeptid der Formel (II) kann in an sich bekannter Weise - durch die Azid-, Anhydrid- oder Carbodiimidmethode, die Methode des aktivierten Esters oder andere bekannte Aktivierungsmethoden - mittels Fragmentkondensation oder schrittweiser Kettenverlängerung hergestellt werden. Das Tri- oder Tetrapeptid H-Leu-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Y, worin die Bedeutung von Y die gleiche wie oben ist, wird mit einem an der Aminogruppe durch tert.-Butoxycarbonyl- oder Benzyloxycarbonylgruppe geschützten Asparaginsäurederivat der allgemeinen Formel (VIII)



worin die Bedeutung von X und E die gleiche wie oben ist und Z tert.-Butyloxycarbonyl- oder Benzyloxycarbonylgruppe bedeutet - acyliert und von der erhaltenen Verbindung wird die Schutzgruppe entfernt.

Das im Verfahren a) erforderliche Hexapeptid der Formel (III) wird zweckmässig hergestellt, indem man ein Asparaginsäurederivat der allgemeinen Formel (IX)



worin die Bedeutung von X die gleiche wie oben ist und R<sub>3</sub> für Wasserstoff, Methyl-, Benzyl- oder tert.-Butylgruppe steht, mit dem Pentapeptidazid Glp-His-Trp-Ser-Tyr-N<sub>3</sub> acyliert.

Die im Verfahren a) angewendete Methode zur Peptidsynthese in der festen Phase ist aus der Literatur bekannt (J.M. Stewart: «Solid Phase Peptide Synthesis»; Freeman and Co., San Francisco, 1969).

Mit der automatisch gesteuerten Synthese in der festen Phase (D. Coy et al., Biochemistry 13, 323 [1974]; D. Coy et al., J. Med. Chem. 19, 423 [1976]) wurden schon zahlreiche Gonadoliberin-Analoga hergestellt; das Verfahren a) unterscheidet sich von den bekannten Verfahren darin, dass man als Aminosäure in 6-Stellung ein Aminosäurederivat der allgemeinen Formel (X)



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

Aus dem erhaltenen Nona- beziehungsweise Decapeptidamid kann gewünschtenfalls durch Umsetzen mit einer physiologisch verträglichen Säure ein Säureadditionssalz hergestellt werden. Gewünschtenfalls kann aus dem Säureadditionssalz durch Umsetzen mit einer Base die freie Base erneut hergestellt werden. Gewünschtenfalls kann aus dem Nona- beziehungsweise Decapeptidamid ein Metallkomplex gebildet werden.

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

Ein bevorzugter Vertreter der Verbindungen der allgemeinen Formel (I) ist die Verbindung der Formel (XI)



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

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

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

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

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

Diese Beispiele zeigen, dass die erfindungsgemässen Gonadoliberinanaloga auf die Vermehrungsvorgänge der Wirbeltiere eine grosse Wirkung ausüben. Die Vorteile der Anwendung der Verbindungen in der Tierzucht sind durch zahlreiche Versuche belegt.

Der bedeutende Vorteil der Verbindungen der allgemeinen Formel (I) gegenüber den bisher bekannten hochwirksa-

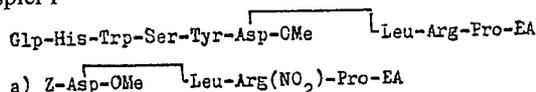
men Gonadoliberinanalogen besteht darin, dass erstere ausschliesslich aus L-Aminosäuren aufgebaut sind. Auch ist ihre Ovulation auslösende und Testosteron freisetzende Wirkung, wie zahlreiche biologische Experimente zeigten, besser als die der in 6-Stellung Glycin oder eine D-Aminosäure enthaltenen sog. superaktiven Gonadoliberinderivate.

Die Erfindung wird an Hand der folgenden Beispiele näher erläutert. Die in den Beispielen angegebenen  $R_f$ -Werte der Dünnschichtchromatographie wurden an Merck-Platten (Kieselgel DC, Alufolie) mit den folgenden Lösungsmittelgemischen bestimmt:

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

Die Schmelzpunkt sind in °C angegeben und nicht korrigiert.

#### Beispiel 1



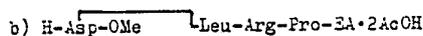
537 mg (1 mMol) des Hydrobromids von H-Leu-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-EA werden in 10 ml Dimethylformamid gelöst. Die Lösung wird bei 0 °C mit 447 mg (1 mMol) Z-Asp(OPFP)-OMe versetzt. Der pH-Wert des Reaktionsgemisches wird unter Rühren mit Triäthylamin auf 8 eingestellt. Nach 6 Stunden wird die Lösung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

$C_{32}H_{49}N_9O_{10}$ : 719,6

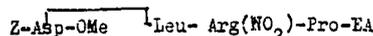
Schmelzpunkt: 128–184 °C

$[\alpha]_D^{25}$ : -58,4° (c=1, Methanol)

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



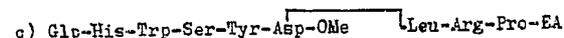
400 mg (0,56 mMol) des Tetrapeptids



werden in 20 ml 50%iger Essigsäure gelöst und in Gegenwart von 50 mg 10%iger Palladiumaktivkohle 4 Stunden lang hydriert. Der Katalysator wird abfiltriert, die Essigsäure im Vakuum entfernt, der Rückstand mit Äther verrieben, filtriert und im Vakuum getrocknet. Ausbeute: 360 mg (97%).

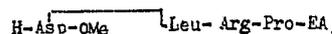
$C_{28}H_{52}N_8O_{10}$ : 660,5

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



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

10 Minuten lang gerührt. Dann gibt man die aus 660 mg (1 mMol) des Diacetats von



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

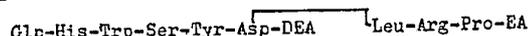
$C_{58}H_{80}N_{16}O_{14}$ : 1225

$[\alpha]_D^{25}$ : -53,4° (c=1, Wasser)

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

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

#### Beispiel 2



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

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

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

$[\alpha]_D^{25}$ : -58,4° (c=1, Methanol)

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

##### b) BOC-Asp-DEA

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

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

$[\alpha]_D^{25}$ : -60,1° (c=1, Methanol)

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

##### c) BOC-Asp(OPFP)-DEA

2,9 g (10 mMol) tert.-Butyloxycarbonyl-asparaginsäure-α-diäthylamid werden bei 0 °C unter Rühren in 100 ml Äthylacetat gelöst. Zu der Lösung werden 1,84 g (10 mMol) Pentafluorphenol und 2,26 g (11 mMol) Dicyclohexylcarbodiimid gegeben. Das Reaktionsgemisch wird bei 0 °C 30 Minuten lang und dann bei Raumtemperatur 24 Stunden lang gerührt. Der Niederschlag wird abfiltriert, das Filtrat eingedampft, der Rückstand mit Petroläther behandelt, der ausgeschiedene Niederschlag erneut abfiltriert und die Lösung dann einge-

dampft. Nach dem Trocknen erhält man 4,4 g (99%) eines farblosen Öls.

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

$[\alpha]_D^{25}$ :  $-75,0^\circ$  ( $c=1$ , Methanol)

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

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

536 mg (1 mMol) des Hydrobromids von H-Leu-Arg(NO<sub>2</sub>)-Proäthylamid werden in 5 ml Dimethylformamid gelöst. Die Lösung wird auf 0 °C gekühlt und zuerst mit 0,14 ml (1 mMol) Triäthylamin, dann mit 453 mg (1 mMol) tert.-Butyloxycarbonylaspartyl- $\alpha$ -diäthylamid- $\beta$ -pentafluorphenylester versetzt. Das Reaktionsgemisch wird bei Raumtemperatur 5 Stunden lang gerührt, und dabei wird der pH-Wert von Zeit zu Zeit auf neutral gestellt. Das Reaktionsgemisch wird eingedampft, der Rückstand mit Äther verrieben und dann filtriert. Das erhaltene Rohprodukt (etwa 780 mg) wird an einer Silikagelsäule mit dem im Verhältnis 4:1:1 bereiteten Gemisch von Butanol, Essigsäure und Wasser chromatographisch gereinigt. Die entsprechenden Fraktionen werden gesammelt und im Vakuum zur Trockne eingedampft. Durch Verreiben des Rückstandes mit Äther erhält man 474 mg (64%) eine weissen Pulvers.

$C_{32}H_{57}N_{10}O_9$ : 725,6

$[\alpha]_D^{25}$ :  $-77,2^\circ$  ( $c=1$ , Methanol)

Schmelzpunkt: 132–133 °C

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

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

730 mg (1 mMol) des Tetrapeptids

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

werden in 20 ml 5%iger Essigsäure gelöst und in Gegenwart von 100 mg 10%iger Palladiumaktivkohle 3 Stunden lang hydriert. Das durch Eindampfen des Gemisches gewonnene Produkt ist ein chromatographisch einheitliches Öl.

$C_{34}H_{63}N_9O_9$ : 741,6

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

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

740 mg (1 mMol) des Tetrapeptides

$\text{BOC-Asp-DEA} \text{---} \text{Leu-Arg-Pro-EA}$

werden in 10 ml Trifluoressigsäure gelöst. Die Lösung wird bei Raumtemperatur 15 Minuten lang gerührt und dann im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wird mit Äther verrieben, filtriert und über Lauge getrocknet. Man erhält 780 mg (96%) einer schwach hygroskopischen Substanz.

$C_{31}H_{53}O_9N_9F_6$ : 809,2

$[\alpha]_D^{25}$ :  $-40,6^\circ$  ( $c=1$ , Wasser)

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

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

286 mg (0,4 mMol) des Pentapeptidhydrazids Glp-His-Trp-Ser-Tyr-N<sub>2</sub>H<sub>3</sub> werden in 25 ml Dimethylformamid gelöst. Die Lösung wird auf  $-10^\circ\text{C}$  gekühlt und unter Rühren tropfenweise zuerst mit 0,27 ml 6n Salzsäure, dann mit der konzentrierten wässrigen Lösung von 30,2 mg Natriumnitrit versetzt. Nach 5 Minuten werden 353 mg des Trifluoressigsäureacetats von

$\text{H-Asp-Dea} \text{---} \text{Leu-Arg-Pro-EA}$

in Form einer mit 1 ml Dimethylformamid und 0,27 ml Triäthylamin bereiteten, auf  $-10^\circ\text{C}$  gekühlten Lösung zugege-

ben. Erforderlichenfalls wird das Reaktionsgemisch mit Triäthylamin neutralisiert und bei  $-5^\circ\text{C}$  eine Stunde, bei  $0^\circ\text{C}$  eine weitere Stunde und schliesslich bei Raumtemperatur 12 Stunden lang gerührt.

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

$C_{65}H_{95}N_{17}O_{17}$ : 1385

Schmelzpunkt: 180–181 °C

15  $[\alpha]_D^{25}$ :  $-64,2^\circ$  ( $c=1$ , Methanol)

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

Aminosäureanalyse: Asp: 1,0, Ser: 0,99, Glu: 1,01, Leu:

1,10, Tyr: 1,00, His: 0,92, Arg: 0,98

20 Beispiel 3

$\text{Glp-His-Trp-Ser-Tyr-Asp-NH}_2 \text{---} \text{Leu-Arg-Pro-Gly-NH}_2$

a) BOC-Asp(OBzl)-OPFP

3,23 g (10 mMol) tert.-Butyloxycarbonyl-asparagin-

25 säure- $\beta$ -benzylester werden in 50 ml Äthylacetat gelöst. Die Lösung wird auf  $0^\circ\text{C}$  gekühlt und unter Rühren mit 1,84 g (10 mMol) Pentafluorphenol und 2,26 g (11 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid versetzt. Das Gemisch wird bei  $0^\circ\text{C}$  30 Minuten lang und dann bei Raumtemperatur 12 Stunden lang gerührt. Nach dem Filtrieren wird die Lösung im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wird in 15 ml Äther gelöst und durch Zusatz von 15 ml Petroläther bei  $-20^\circ\text{C}$  kristallisiert.

Ausbeute: 3,75 g (70%).

$C_{22}H_{20}NO_6F_5$ : 489,3

35 Schmelzpunkt:  $84^\circ\text{C}$

$[\alpha]_D^{25}$ :  $-18,1^\circ$  ( $c=1$ , Äthylacetat)

Rf (7) = 0,9; Rf (4) = 0,95

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

Zu der mit 10 ml Methanol bereiteten Lösung von 970 mg

40 (2 mMol) tert.-Butyloxycarbonyl-asparaginsäure- $\beta$ -benzylester- $\alpha$ -pentafluorphenylester werden 10 ml bei  $0^\circ\text{C}$  mit Ammoniak gesättigten Methanols gegeben. Die Lösung wird bei  $0^\circ\text{C}$  30 Minuten lang gerührt und dann im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wird aus einem Gemisch von 45 Methanol und Äther kristallisiert.

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

berechnet, %: C 59,62 H 6,83 N 8,69

gefunden, %: C 59,2 H 6,98 N 8,8

Schmelzpunkt: 159–161 °C

50  $[\alpha]_D^{25}$ :  $+1,1^\circ$  ( $c=1$ , Methanol)

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

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

480 mg (1,5 mMol) tert.-Butyloxycarbonyl-asparagin-

55 säure- $\beta$ -benzylester- $\alpha$ -amid werden in 10 ml Methanol gelöst und in Gegenwart von 50 mg 10%iger Palladiumaktivkohle eine Stunde lang hydriert. Der Katalysator wird abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird aus wässrigem Äthanol kristallisiert. Ausbeute: 246 mg (93%).

$C_9H_{16}N_2O_5$ : 232,2

Schmelzpunkt: 145–146 °C

$[\alpha]_D^{25}$ :  $2,2^\circ$  ( $c=1$ , Methanol)

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

65

d)  $\text{Glp-His-Trp-Ser-Tyr-Asp-NH}_2 \text{---} \text{Leu-Arg-Pro-Gly-NH}_2$

Die Synthese des Peptids an der festen Phase, seine Abspaltung von dieser mittels Fluorwasserstoff und die chro-

matographische Reinigung des Peptids werden auf die unter Punkt c) des Beispiels 4 beschriebene Weise vorgenommen mit dem Unterschied, dass man als Aminosäure in 6-Stellung die gemäss Punkt c) des Beispiels 3 hergestellte Verbindung verwendet. Man erhält 72 mg (12%) reine Substanz.

$C_{57}H_{79}N_{18}O_{14}$ : 1239

$[\alpha]_D^{25}$ :  $-55,5^\circ$  ( $c=1$ , Wasser)

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

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

#### Beispiel 4

Glp-His-Trp-Ser-Tyr-Asp-FBA-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>

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

$C_{26}H_{33}N_2O_5Cl$ : 488,2

Schmelzpunkt: 60–61 °C

$[\alpha]_D^{25}$ :  $-12,2^\circ$  ( $c=1$ , Methanol)

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

b) BOC-Asp-FBA

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

Ausbeute: 1,5 g (87%).

Elementaranalyse für  $C_{19}H_{28}N_2O_5$  (364,2)

berechnet, %: C 62,63 H 7,69

gefunden, %: C 62,3 H 7,58

Schmelzpunkt: 94–96 °C

$[\alpha]_D^{25}$ :  $-19^\circ$  ( $c=1$ , Methanol)

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

c) Glp-His-Trp-Ser-Tyr-Asp-FBA-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>

1 g (0,5 mMol) Benzhydrolamin-Polymer wird in das Reaktionsgefäss eines automatischen Peptidsynthesators (Beckman 990B) eingebracht und 4 Stunden lang mit 30 ml Dichlormethan gerührt. Die geschützten Aminosäurederivate werden in der entsprechenden Reihenfolge durch zyklische Wiederholung der folgenden Schritte 1–10 an das Polymer gekoppelt:

1. Waschen mit 30 ml Dichlormethan 3 × 3 Minuten
2. Waschen mit dem im Verhältnis 1:2 bereiteten Gemisch von Trifluoressigsäure und Dichlormethan 5 und 25 Minuten
3. Waschen mit 30 ml Dichlormethan 3 × 3 Minuten
4. Waschen mit 30 ml Äthanol 3 × 3 Minuten
5. Waschen mit 30 ml Chloroform 3 × 3 Minuten
6. Waschen mit dem im Verhältnis 1:9 bereiteten Gemisch von Triäthylamin und Chloroform 2 × 10 Minuten
7. Waschen mit 30 ml Chloroform 3 × 3 Minuten
8. Waschen mit 30 ml Dichlormethan 3 × 3 Minuten

9. Inkubieren von 1,5 mMol BOC-Aminosäurederivat und 1,5 mMol Diisopropyl-carbodiimid in 30 ml Dichlormethan 120 Minuten

10. Waschen mit 30 ml Dichlormethan 3 × 3 Minuten.

Die Reihenfolge der geschützten Aminosäurederivate ist folgende: BOC-Gly-OH, BOC-Pro-OH, BOC-Arg(Tos)-OH, BOC-Leu-OH, BOC-Asp-FBA, BOC-Tyr(Bzl)-OH, BOC-Ser(Bzl)-OH, BOC-Trp-OH, BOC-His(Tos)-OH und Glp.

Nachdem alle Aminosäuren gekoppelt wurden, wird das fertige Peptidpolymerharz im Vakuum getrocknet und mit 50 ml verflüssigtem Fluorwasserstoff in Gegenwart von 6 ml Anisol bei 0 °C 45 Minuten lang gerührt. Der Fluorwasserstoff wird mit wasserfreiem Stickstoff entfernt und der Niederschlag mit Äther ausgefällt. Die abfiltrierte Substanz wird in 50%iger Essigsäure suspendiert, erneut abfiltriert und das Filtrat im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wird in 50%iger Essigsäure gelöst und die Lösung über eine Säule aus Sephadex G-25 filtriert. Die reine Hauptfraktion wird mit dem Lösungsmittelgemisch 10 an einer Silikagelsäule chromatographiert. Die entsprechenden Fraktionen werden eingedampft und lyophilisiert. Ausbeute: 70 mg (10%)

$C_{67}H_{91}N_{18}O_{14}$ : 1371

$[\alpha]_D^{25}$ :  $-56,4^\circ$  ( $c=1$ , Wasser)

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

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

#### Beispiel 5

Glp-His-Trp-Ser-Tyr-Asp-CBA-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>

a) BOC-Asp(OBzl)-CBA 2,4 g (5 mMol) des gemäss Beispiel 3a) hergestellten tert.-Butyloxycarbonyl-asparaginsäure- $\beta$ -benzylester- $\alpha$ -pentafluorphenylesters werden in 20 ml Äthylacetat gelöst. Die Lösung wird auf 0 °C gekühlt und tropfenweise mit der gekühlten Lösung von 0,42 ml (5 mMol) Cyclobutylamin in 2 ml Äthylacetat versetzt. Das Reaktionsgemisch wird bei Raumtemperatur 2 Stunden lang gerührt, dann mit 10%iger Citronensäure, anschliessend mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und schliesslich mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, dann über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wird in Äther gelöst und durch Zusatz von Petroläther kristallisiert. Ausbeute: 1,16 g (89%).

$C_{20}H_{28}N_2O_5$ : 376,2

Schmelzpunkt: 84–86 °C

$[\alpha]_D^{25}$ :  $-5,7^\circ$  ( $c=1$ , Methanol)

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

b) BOC-Asp-CBA

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

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

berechnet, %: C 54,54 H 7,69

gefunden, %: C 53,9 H 7,68

Schmelzpunkt: 149–150 °C

$[\alpha]_D^{25}$ :  $-9,5^\circ$  ( $c=1$ , Methanol)

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

c) Glp-His-Trp-Ser-Tyr-Asp-CBA-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>

Die Synthese des Peptids an der festen Phase und seine Abspaltung von dieser mittels Fluorwasserstoff sowie die chromatographische Reinigung des rohen Peptids werden auf

die im Punkt c) des Beispiels 4 beschriebene Weise vorgenommen mit dem Unterschied, dass man als Aminosäure in 6-Stellung die gemäss Punkt b) des Beispiels 5 hergestellte Verbindung verwendet. Man erhält 68 mg (10,5%) reines Peptid.

$C_{61}H_{85}N_{18}O_{14}$ : 1291

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

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

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

#### Beispiel 6

Glp-His-Trp-Ser-Tyr-Asp-PIR-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>

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

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

$C_{20}H_{28}N_2O_5$ : 376,2

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

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

##### b) BOC-Asp-PIR

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

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

Schmelzpunkt: 124–125 °C

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

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

c) Glp-His-Trp-Ser-Tyr-Asp-FIR-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>

Die Synthese des Peptids an der festen Phase, seine Abspaltung von dieser mittels Fluorwasserstoff und die chromatographische Reinigung des rohen Peptids werden auf die im Punkt c) des Beispiels 4 beschriebene Weise vorgenommen mit dem Unterschied, dass man als Aminosäure in 6-Stellung die gemäss Punkt b) des Beispiels 6 hergestellte Verbindung verwendet. Man erhält 78 mg (12%) reines Peptid.

$C_{61}H_{85}N_{18}O_{14}$ : 1293

$[\alpha]_D^{22}$ :  $-53,2^\circ$  ( $c=1$ , Wasser)

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

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

#### Beispiel 7

Glp-His-Trp-Ser-Tyr-Asp-IND-Leu-Arg-Pro-EA

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

3,23 g (10 mMol) tert.-Butyloxycarbonyl-asparaginsäure-β-benzylester werden in 50 ml Äthylacetat gelöst. Die Lösung wird auf 0 °C gekühlt und unter Rühren mit 2,3 g Dicyclohexyl-carbodiimid und 1,19 g Indolin versetzt. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, anderntags filtriert und das Filtrat dreimal mit

10%iger Citronensäure, dreimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und schliesslich dreimal mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen. Die Lösung wird über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und dann eingedampft. Das zurückbleibende Öl wird mit Wasser aus Äthanol kristallisiert.

Ausbeute: 3,7 g (89%)

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

Schmelzpunkt: 75–76 °C

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

Rf (7) = 0,9

##### b) H-Asp(OBzl)-IND·TFA

800 mg (1,9 mMol) tert.-Butyloxycarbonyl-asparaginsäure-β-benzylester-α-indolin werden in 5 ml Trifluoressigsäure gelöst. Die Lösung wird bei Raumtemperatur 15 Minuten lang gerührt. Die Trifluoressigsäure wird im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird mit Äther verrieben, filtriert, getrocknet und aus Äthanol durch Zusatz von Äther kristallisiert.

Ausbeute: 780 mg (94%)

$C_{21}H_{21}N_2O_5F_3$ : 438,1

Schmelzpunkt: 114–115 °C

$[\alpha]_D^{22}$ :  $-5,8^\circ$  ( $c=1$ , Methanol)

Rf (7) = 0,2; Rf (4) = 0,65

25 c) Glp-His-Trp-Ser-Tyr-Asp(OBzl)-IND

716 mg (1 mMol) des Pentapeptidhydrazids Glp-His-Trp-Ser-Tyr-N<sub>2</sub>H<sub>3</sub> werden in 10 ml Dimethylformamid gelöst. Die Lösung wird auf  $-10^\circ\text{C}$  gekühlt und zuerst mit 0,7 ml 6n Salzsäure und dann mit der gesättigten wässrigen Lösung von 75 mg Natriumnitrit versetzt. Das Reaktionsgemisch wird bei  $-5^\circ\text{C}$  10 Minuten lang gerührt. Dann wird die mit 0,7 ml Triäthylamin und 2 ml Dimethylformamid bereitete Lösung von 438 mg (1 mMol) des Trifluoacetats von H-Asp(OBzl)-indolid zugegeben. Erforderlichenfalls wird der pH-Wert mit Triäthylamin auf 8 eingestellt. Das Gemisch wird bei  $-5^\circ\text{C}$  eine Stunde lang und dann bei 0 °C noch 12 Stunden lang gerührt. Das Dimethylformamid wird im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird mit Wasser verrieben, abfiltriert, mit Äthanol und Äthylacetat gewaschen, dann in Dimethylformamid gelöst, die Lösung heiss mit Aktivkohle geklärt und das Produkt durch Zusatz von Äther ausgefällt. Ausbeute: 600 mg (60%).

$C_{53}H_{56}N_{10}O_{11}$ : 1008,9

Schmelzpunkt: 172–174 °C

Rf (9) = 0,7; Rf (10) = 0,4; Rf (1) = 0,35

##### d) Glp-His-Trp-Ser-Tyr-Asp-IND

500 mg (0,5 mMol) des Hexapeptids Glp-His-Trp-Ser-Tyr-Aps(OBzl)-IND werden in einem Gemisch aus 0,5 ml Dimethylformamid und 30 ml 50%iger Essigsäure gelöst und in Gegenwart von 50 mg 10%iger Palladiumaktivkohle 2 Stunden lang hydriert. Der Katalysator wird abfiltriert und das Filtrat im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wird aus Dimethylformamid durch Zusatz von Äther kristallisiert.

Ausbeute: 380 mg (83%)

55  $C_{46}H_{50}N_{10}O_{11}$ : 918,9

Schmelzpunkt: 219–221 °C

$[\alpha]_D^{22}$ :  $-37,7^\circ$  ( $c=1$ , Dimethylformamid)

Rf (9) = 0,6; Rf (10) = 0,4; Rf (1) = 0,1

60 e) Glp-His-Trp-Ser-Tyr-Asp-IND-Leu-Arg-Pro-EA

Die mit 1 ml Dimethylformamid bereitete Lösung von 42 mg (0,044 mMol) des Hexapeptids Glp-His-Trp-Ser-Tyr-Asp-IND wird auf 0 °C gekühlt und unter Rühren mit 7,8 µl Diisopropyl-carbodiimid versetzt. Nach 10 Minuten wird die mit Dimethylformamid bereitete, mit Triäthylamin neutralisierte Lösung von 20 mg (0,044 mMol) H-Leu-Arg-Pro-EA-hydrochlorid zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird bei

Raumtemperatur 12 Stunden lang gerührt und dann im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wird an einer Säule aus Sephadex G-25 mit 0,2n Essigsäure chromatographiert. Die das Hauptprodukt enthaltenden Fraktionen werden gemischt und lyophilisiert. Ausbeute: 28 mg (48%).

$C_{65}H_{85}N_{17}O_{13}$ : 1311

$[\alpha]_D^{22}$ :  $-39,6^\circ$  (c = 0,25, 25%ige Essigsäure)

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

#### Beispiel 8

GLP-His-Trp-Ser-Tyr-Asp-ANI-L-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>

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

3,23 g (10 mMol) tert.-Butyloxycarbonyl-asparaginsäure-β-benzylester werden in 50 ml Äthylacetat gelöst. Die Lösung wird auf 0 °C gekühlt und mit 0,96 g Anilin sowie 2,26 g Dicyclohexyl-carbodiimid versetzt. Das Gemisch wird bei Raumtemperatur 6 Stunden lang gerührt und dann filtriert. Das Filtrat wird mit 10%iger Citronensäure, dann mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und schliesslich mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingedampft. Die beim Eindampfen erhaltenen Kristalle werden mit Petroläther verrieben, filtriert und getrocknet. Ausbeute: 4 g (96%)

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

Schmelzpunkt: 105–106 °C

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

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

##### b) BOC-Asp-ANI

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

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

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

10 gefunden, %: C 58,6 H 6,56

Schmelzpunkt: 157–158 °C

$[\alpha]_D^{22}$ :  $-12^\circ$  (c = 1, Dimethylformamid)

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

##### c) GLP-His-Trp-Ser-Tyr-Asp-ANI-L-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>

15 Die Synthese des Peptids an der festen Phase, seine Abtrennung von dieser mittels Fluorwasserstoff und die chromatographische Reinigung des erhaltenen rohen Peptids werden auf die im Punkt c) des Beispiels 4 beschriebene Weise  
20 vorgenommen mit dem Unterschied, dass man als Aminosäure in 6-Stellung die gemäss dem Punkt b) des Beispiels 8 hergestellte Verbindung verwendet. Man erhält 82 mg (12,5%) reines Produkt.

$C_{63}H_{83}N_{18}O_{14}$ : 1315

25  $[\alpha]_D^{22}$ :  $-58,3^\circ$  (c = 1, Wasser)

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

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