

Brevet N°	8 1 7 3 3
du	28 septembre 1979
Titre délivré :	29 10 1979



Monsieur le Ministre
de l'Économie Nationale et des Classes Moyennes
Service de la Propriété Industrielle
LUXEMBOURG

Demande de Brevet d'Invention

I. Requête

La société dite: ELI LILLY AND COMPANY, 307 East McCarty Street, à INDIANAPOLIS, Etat de Indiana, Etats-Unis d'Amérique, (1)
représentée par Monsieur Jacques de Muysen, agissant en (2)
qualité de mandataire

dépose ce vingt-huit septembre 1900 soixante-dix-neuf (3)
à 15 heures, au Ministère de l'Économie Nationale et des Classes Moyennes, à Luxembourg :

1. la présente requête pour l'obtention d'un brevet d'invention concernant :
"Peptides apparentés à la somatostatine et leur utilisation (4)
thérapeutique".

déclare, en assumant la responsabilité de cette déclaration, que l'(es) inventeur(s) est (sont) :
James Edwin SHIELDS, 7229 Wynter Way, à INDIANAPOLIS, (5)
Indiana, Etats-Unis d'Amérique

2. la délégation de pouvoir, datée de INDIANAPOLIS le 14 septembre 1979
3. la description en langue française de l'invention en deux exemplaires ;
4. // planches de dessin, en deux exemplaires ;
5. la quittance des taxes versées au Bureau de l'Enregistrement à Luxembourg,

le 28 septembre 1979

revendique pour la susdite demande de brevet la priorité d'une (des) demande(s) de
(6) brevet déposée(s) // (7) aux Etats-Unis d'Amérique
le 2 octobre 1978 (No. 948,117) (8)

au nom de l'inventeur (9)

élit domicile pour lui (elle) et, si désigné, pour son mandataire, à Luxembourg
35, bld. Royal (10)

sollicite la délivrance d'un brevet d'invention pour l'objet décrit et représenté dans les annexes
susmentionnées, — avec ajournement de cette délivrance à // mois.

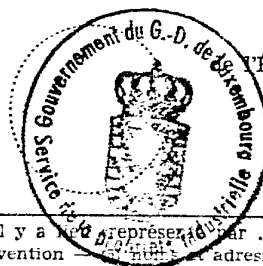
Le mandataire

II. Procès-verbal de Dépôt

La susdite demande de brevet d'invention a été déposée au Ministère de l'Économie Nationale et des Classes Moyennes, Service de la Propriété Industrielle à Luxembourg, en date du :

28 septembre 1979

à 15 heures



Pr. le Ministre
de l'Économie Nationale et des Classes Moyennes,
p. d.

REVENDEICATION DE LA PRIORITE

de la demande de brevet / du modèle d'utilité /

/ En ,Aux ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Du 2 OCTOBRE 1978

Mémoire Descriptif

déposé à l'appui d'une demande de

BREVET D'INVENTION

au

Luxembourg

au nom de : ELI LILLY AND COMPANY

pour : "Peptides apparentés à la somatostatine et leur utilisation thérapeutique".

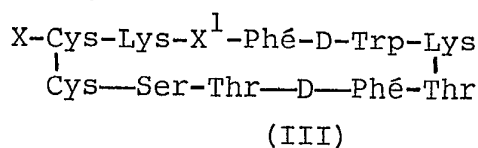
particuliers ou des groupements fonctionnels initialement présents dans la molécule de somatostatine manquent ou sont remplacés par d'autres amino-acides ou groupements fonctionnels.

- 5 La présente invention concerne de nouveaux polypeptides synthétiques actifs sur le plan biologique que l'on peut considérer comme des modifications de la formule de la somatostatine. Les polypeptides de l'invention diffèrent de la somatostatine par les caractéristiques suivantes :
- 10 (a) Le segment Ala¹-Gly² est remplacé par Ala-D-Ala, D-Ala-Gly ou D-Val-Gly ;
- (b) Le segment Asn⁵-Phe⁶ est remplacé par Ala-Leu, Ala-Phé, Ala-D-Phé, D-Ala-Phé ou D-Ala-Cha ;
- (c) Le reste Trp⁸ est remplacé par un reste D-Trp ; et
- 15 (d) Le reste Phé¹¹ est remplacé par un reste D-Phé.

Tous les amino-acides ou restes amino-acides optiquement actifs des polypeptides décrits ici ont la configuration naturelle ou L, à moins d'indication contraire. Les symboles identifiant les amino-acides et les restes amino-

20 acides dans les polypeptides décrits ici sont ceux adoptés par IUPAC-IVB Committee on Biochemical Nomenclature Recommendation (1971), et sont décrits dans Archives of Biochemistry and Biophysics, 150, 1-8 (1972). Le symbole "Cha" désigne le groupement cyclohexylalanine.

25 La présente invention fournit des tétradécapeptides de formule :



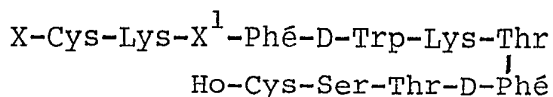
30 dans laquelle :

X est H-Ala-D-Ala, H-D-Ala-Gly ou H-D-Val-Gly ; et
X¹ est Ala-Leu, Ala-Phé, Ala-D-Phé, D-Ala-Phé ou D-Ala-Cha :

ou un de leurs sels d'addition d'acide pharmaceutiquement acceptables non toxiques.

35

On prépare les composés de formule (III) en faisant réagir la forme linéaire (IV)



(IV)

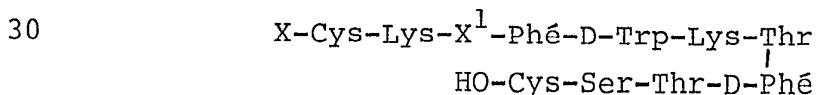
avec un agent oxydant.

5 Les peptides de formule (III) sont biologiquement actifs et inhibent la sécrétion de l'hormone de croissance sans inhiber de façon importante la sécrétion de l'insuline et du glucagon, comme on l'a montré in vivo sur des animaux de laboratoire en utilisant des modes opératoires d'essais
10 pharmacologiques classiques. En raison de cette spécificité, les peptides sont particulièrement utiles dans le traitement du diabète et d'autres états pathologiques (par exemple acromégalie) caractérisés par une sécrétion anormalement élevée de l'hormone de croissance.

15 Les modes de réalisation préférés des peptides décrits par la formule (III) sont ceux dans lesquels :

- (i) X est H-D-Val-Gly et X¹ est Ala-Leu (c'est-à-dire la D-Val¹, Ala⁵, Leu⁶, D-Trp⁸, D-Phé¹¹-somatostatine)
- (ii) X est H-D-Val-Gly et X¹ est Ala-Phé (c'est-à-dire la
20 D-Val¹, Ala⁵, D-Trp⁸, D-Phé¹¹-somatostatine)
- (iii) X est H-D-Val-Gly et X¹ est Ala-D-Phé (c'est-à-dire la D-Val¹, Ala⁴, D-Phé⁶, D-Trp⁸, D-Phé¹¹-somatostatine)
- (iv) X est H-D-Ala-Gly et X¹ est Ala-Phé (c'est-à-dire la D-Ala¹, Ala⁵, D-Trp⁸, D-Phé¹¹-somatostatine)
- 25 (v) X est Ala-D-Ala et X¹ est Ala-Phé (c'est-à-dire la D-Ala², Ala⁵, D-Trp⁸, D-Phé¹¹-somatostatine).

La présente invention considère également la forme linéaire intermédiaire (IV) des tétradécapeptides de formule (III) :

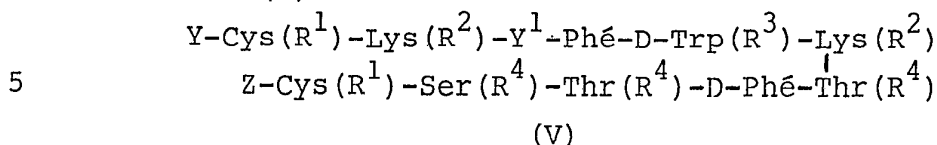


(IV)

ou un de ses sels d'addition d'acide non toxique ; dans laquelle X et X¹ sont tels que définis précédemment pour la
35 formule (III). Les peptides linéaires de formule (IV) sont des précurseurs de la préparation des peptides de formule (III). Dans la forme cyclique (III), les deux restes cystéine (Cys³ et Cys¹⁴) sont liés par l'intermédiaire d'une liaison disulfure formée entre les fonctions sulphydryle des

chaînes latérales.

L'invention considère également les peptides protégés de formule (V) :



dans laquelle :

- Y est R-Ala-D-Ala, R-D-Ala-Gly ou R-D-Val-Gly où
 R est H ou un groupement protecteur des groupes
 10 α-amino ;
- Y^1 est Ala-Leu, Ala-Phé, Ala-D-Phé, D-Ala-Phé ou
 D-Ala-Cha ;
- R^1 est un groupement protecteur des groupements
 sulfhydryle ;
- 15 R^2 est un groupement protecteur des groupements
 ε-amino ;
- R^3 est un atome d'hydrogène ou un groupement formyle ;
- R^4 est un groupement protecteur des groupements
 hydroxy ; et
- 20 Z est -OH, -OCH₃, ou -O-CH₂-[résine de polystyrène] ;
 et, quand R ou R^3 est H, leurs sels d'addition d'acides non
 toxiques.

Les peptides de formule (V) sont des intermédiaires dans la synthèse des peptides de formules (III) et (IV).

- 25 Pour synthétiser les peptides de formule (III), on construit la chaîne peptidique par étapes par copulation successive des amino-acides en commençant par l'extrémité à C terminal de la chaîne. Pendant chaque copulation, les amino-acides doivent être protégés sur le groupement α-amino
- 30 et, si nécessaire, sur les groupements fonctionnels réactifs de la chaîne latérale pour empêcher la formation de produits secondaires indésirables. Dans les peptides de formule (V), les groupements protecteurs représentés par R, R^1 , R^2 et R^4 sont utilisés pour bloquer les groupements α-amino ou les
- 35 groupements de la chaîne latérale réactifs des différents amino-acides pendant leur incorporation dans la chaîne peptidique. Les groupements protecteurs représentés par R, R^1 , R^2 et R^4 peuvent donc être un quelconque groupement connu dans le domaine comme utilisable dans la synthèse par étapes des

polypeptides. De tels groupements sont bien connus et le choix d'un groupement protecteur particulier ainsi que son procédé d'utilisation seront facilement évidents pour l'homme de l'art. Des exemples types de groupements protecteurs pour R, R¹, R² et R⁴ sont indiqués ci-dessous :

A. Pour un groupement α -amino présent dans le reste amino-acide à N terminal, R peut être :

- (a) des groupements de type acyle, comme les groupements formyle, trifluoracétyle, phtalyle, p-toluène-sulfonyle (tosyle), benzènesulfonyle, nitrophényl-sulfonyle, etc ...
- (b) des groupements de type uréthane aromatique, comme les groupements benzyloxy-carbonyle et benzyloxy-carbonyle substitué, par exemple : p-chlorobenzyl-oxy-carbonyle, p-bromobenzyl-oxy-carbonyle, p-nitro-benzyl-oxy-carbonyle, p-méthoxybenzyl-oxy-carbonyle, o-chlorobenzyl-oxy-carbonyle, 2,4-dichlorobenzyl-oxy-carbonyle, 2,6-dichlorobenzyl-oxy-carbonyle, etc ...
- (c) des groupements de type uréthane aliphatique comme les groupements t-butyloxy-carbonyle, t-amyl-oxy-carbonyle, isopropyloxy-carbonyle, 2-(p-biphényl)-isopropyloxy-carbonyle, allyloxy-carbonyle, etc ...
- (d) des groupements de type uréthane cycloalkylique comme les groupements cyclopentyloxy-carbonyle, cyclohexyloxy-carbonyle, cycloheptyloxy-carbonyle, adamantyloxy-carbonyle, etc ...
- (e) des groupements de type thio-uréthane comme le groupement phénylthiocarbonyle ;
- (f) des groupements de type alkyle comme le groupement triphénylméthyle ; ou
- (g) des groupements trialkylsilane comme un groupement triméthylsilane. Le groupement protecteur préféré défini par R pour les groupements α -amino est le groupement t-butyloxy-carbonyle (BOC).

B. Pour le groupement sulfhydryle présent dans la cystéine, R¹ peut être un groupement benzyle ou benzyle substitué (par exemple 3,4-diméthylbenzyle, p-méthoxybenzyle, p-méthylbenzyle, p-chlorobenzyle, p-nitrobenzyle), trityle, benzyloxy-carbonyle, benzhydryle, p-méthoxybenzyloxy-

carbonyle, benzylthiométhyle, éthylcarbamoyle, thio-
éthyle, tétrahydropyranyle, acétamidométhyle, benzoyle,
etc ... Le groupement protecteur préféré du groupement
sulfhydryle, défini par R^1 , est le groupement p-méthoxy-
benzyle (MBzl).

C. Pour le groupement protecteur du groupement ϵ -amino pré-
sent sur la lysine, R^2 peut être l'un des groupements
mentionnés ci-dessus pour la protection d'un groupement
 α -amino. Des groupements types comprennent, par exemple,
les groupements benzyloxycarbonyle, p-chlorobenzyloxy-
carbonyle, p-bromobenzyloxycarbonyle, o-chlorobenzyloxy-
carbonyle, 2,6-dichlorobenzyloxycarbonyle, 2,4-dichloro-
benzyloxycarbonyle, o-bromobenzyloxycarbonyle, p-nitro-
benzyloxycarbonyle, t-butyloxycarbonyle, isopropyloxy-
carbonyle, t-amylloxycarbonyle, cyclopentyloxycarbonyle,
cyclohexyloxycarbonyle, cycloheptyloxycarbonyle,
adamantyloxycarbonyle, p-toluènesulfonyle, etc ... Le
groupement protecteur préféré défini par R^2 , pour les
groupements ϵ -amino, est le groupement o-chlorobenzyloxy-
carbonyle (ClBzl).

D. Pour le groupement hydroxyle de la sérine ou de la
thréonine, R^4 peut être un groupement alkyle en C_1-C_4
(par exemple méthyle, éthyle, t-butyle), benzyle, benzyle
substitué (par exemple p-méthoxybenzyle, p-nitrobenzyle,
p-chlorobenzyle, o-chlorobenzyle), alcanoyle en C_1-C_3
(par exemple formyle, acétyle, propionyle), triphényl-
méthyle ou benzoyle. Le groupement protecteur préféré
défini par R^4 est le groupement benzyle (Bzl).

Le groupement R^3 représente un atome d'hydrogène ou un
groupement formyle substitué sur l'azote du noyau indole du
tryptophane. L'utilisation d'un groupement formyle comme
groupement protecteur est facultative. R^3 est de préférence
un atome d'hydrogène.

Dans la formule (V), quand Z représente un groupement
"-O-CH₂-[résine de polystyrène]", la chaîne peptidique est
fixée à la résine de polystyrène par l'intermédiaire d'une
liaison ester, (-Cys-O-CH₂-), formée entre le groupement
carboxyle de la partie cystéine à C terminal et l'un des
groupements méthylène présents sur la résine constituant des

sites permettant une telle fixation. La résine de polystyrène est un polymère de styrène qui est réticulée par addition d'environ 0,5 à environ 3 % de vinylbenzène et qui est chlorométhylée ou hydroxyméthylée pour former des sites permettant la formation d'esters. Un exemple d'une résine hydroxyméthylée est décrite par Bodanszky et al. Chem. Ind. (Londres) 38, 1597-98 (1966). Une résine de polystyrène chlorométhylée est disponible dans le commerce chez Lab System, Inc., San Mateo, Californie, U.S.A. La résine est également décrite par Stewart et al Solid Phase Peptide Synthesis, Freeman and Co., San Francisco, Californie, U.S.A., pp. 1-6.

Les tétradécapeptides de cette invention peuvent être préparés soit par des procédés classiques (en solution), soit par la méthode en phase solide en utilisant des techniques généralement connues dans le domaine pour former des liaisons peptidiques. Le peptide peut être assemblé soit en copulant séparant chaque amino-acide, soit en copulant, dans l'ordre approprié, des segments peptidiques préalablement formés et appropriés.

Le procédé préféré de préparation des peptides de formule (III) et des intermédiaires des formules (IV) et (V) se fait par la technique en phase solide dans laquelle la séquence d'acides aminés est construite séquentiellement à partir d'un amino-acide à C-terminal porté par une résine insoluble. Des techniques permettant de mettre en oeuvre la méthode en phase solide sont décrites par J. Stewart et al. Solid Phase Peptide Synthesis, Freeman and Co., San Francisco, U.S.A., 1969.

En général, dans la méthode en phase solide, l'acide aminé correspondant au reste amino-acide à C-terminal du peptide désiré est ancré sur un support de résine insoluble, puis on ferme la chaîne peptidique en commençant à l'acide aminé à C terminal porté par la résine, en introduisant les différents acides aminés un à un jusqu'à ce que l'on obtienne la série désirée d'acides aminés. Ou bien, on peut préparer de petits fragments peptidiques et les introduire dans la chaîne peptidique dans l'ordre désiré. La chaîne peptidique reste fixée à la résine pendant toute la synthèse et, une

fois la chaîne terminée, on coupe les peptides de la résine.

Les amino-acides sont copulés en utilisant des techniques bien connues dans le domaine pour la formation d'une liaison peptidique. Un procédé consiste à transformer
5 l'acide-amino en un dérivé qui rendra le groupement carboxy plus réactif vis-à-vis de la réaction avec le groupement amino à N terminal libre du fragment peptidique. Par exemple, l'acide-amino peut être transformé en anhydride mixte par réaction d'un acide-amino protégé avec le chloroformiate
10 d'éthyle, le chloroformiate de phényle, le chloroformiate de s-butyle, le chloroformiate d'isobutyle, le chlorure de pivaloyle, ou des chlorures d'acides similaires. Ou bien, on peut transformer l'acide-amino en un ester actif comme l'ester 2,4,5-trichlorophénylique, l'ester pentachloro-
15 phénylique, l'ester p-nitrophénylique, l'ester formé à partir du N-hydroxysuccinimide, ou l'ester formé à partir du 1-hydroxybenzotriazole.

Un autre procédé consiste à effectuer la réaction de copulation avec un agent de copulation approprié, comme le
20 N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) ou le N,N'-diisopropylcarbodiimide (DIC). D'autres agents de copulation appropriés seront évidents pour l'homme de l'art. [Voir Schroder et Lubke, The Peptides, Academic Press, 1965, Chapitre III.]

On verra que le groupement α -amino de chaque amino-
25 acide utilisé dans la synthèse des peptides doit être protégé pendant la réaction de copulation pour empêcher des réactions secondaires sur la fonction α -amino réactive. On verra également que certains amino-acides contiennent des groupements fonctionnels réactifs dans les chaînes latérales (par exemple
30 des groupements sulfhydryle, ϵ -amino et hydroxy) et que de tels groupements fonctionnels doivent également être protégés tant pendant la copulation initiale de l'acide-amino comportant le groupement en question que pendant la copulation des amino-acides ultérieurs. Des groupements protecteurs appropriés sont connus dans le domaine [Voir, par exemple,
35 Protective Groups in Organic Chemistry, M. McOmie, Editeur, Plenum Press, N.Y., 1973.]

Lorsque l'on choisit un groupement protecteur particulier, on doit observer les conditions suivantes : un

groupement protecteur d'un groupement α -amino doit : (1) être stable et rendre la fonction α -amino inerte dans les conditions utilisées dans la réaction de copulation, et (2) être facilement éliminable après la réaction de copulation, dans
5 des conditions qui n'éliminent pas les groupements protecteurs des chaînes latérales ou qui ne modifient pas la structure du fragment peptidique. Un groupement protecteur pour la chaîne latérale doit : (1) être stable et rendre le groupement fonctionnel de la chaîne latérale inerte dans les
10 conditions utilisées dans la réaction de copulation, (2) être stable dans les conditions utilisées dans l'élimination du groupement protecteur du groupement α -amino, et (3) être facilement éliminable, une fois obtenue la séquence désirée d'amino-acide, dans des conditions de réaction qui ne modi-
15 fient pas la structure de la chaîne peptidique.

L'homme de l'art verra que les groupements protecteurs connus dans le domaine comme utilisables pour la synthèse des peptides ont une réactivité vis-à-vis des agents acides utilisés pour leur élimination qui est assez variable. Par
20 exemple, certains groupements protecteurs, comme les groupements triphénylméthyle et 2-(p-biphényl)isopropoxyloxycarbonyle, sont très labiles et peuvent être coupés dans des conditions acides modérées. D'autres groupements protecteurs, comme les groupements t-butyloxycarbonyle, t-amylloxycarbonyle,
25 adamantyloxycarbonyle et p-méthoxybenzyloxycarbonyle, sont moins labiles et nécessitent des acides modérément forts (comme l'acide trifluoroacétique, l'acide chlorhydrique, ou le trifluorure de bore dans l'acide acétique) pour leur élimination. D'autres groupements protecteurs, comme les groupe-
30 ments benzyloxycarbonyle, halobenzyloxycarbonyle, p-nitrobenzyloxycarbonyle, cycloalcoxycarbonyle et isopropoxy-carbonyle, sont encore moins labiles et nécessitent pour leur élimination des acides forts, comme l'acide fluorhydrique, l'acide bromhydrique, le trifluoroacétate de bore dans l'aci-
35 de trifluoroacétique.

Une fois la séquence peptidique désirée terminée, il faut couper le peptide protégé du support de résine et éliminer tous les groupements protecteurs. La réaction de coupure et l'élimination des groupements protecteurs peuvent être

effectuées simultanément ou par étapes. Quand le support de résine est une résine de polystyrène chlorométhylée, la liaison fixant le peptide à la résine est une liaison ester formée entre le groupement carboxy libre de la partie cystéine à C terminal et l'un des nombreux groupements chlorométhyle présents sur la matrice de résine. On verra que la liaison de fixation à la résine peut être coupée par des réactifs dont on sait qu'ils peuvent briser une liaison ester et pénétrer dans la matrice de résine. Un procédé particulièrement commode comprend le traitement par l'acide fluorhydrique liquide. Ce réactif non seulement coupera le peptide de la résine mais éliminera également tous les groupements protecteurs. Donc, l'utilisation de ce réactif fournira directement la forme linéaire totalement déprotégée du peptide.

Quand on désire couper le peptide sans enlever les groupements protecteurs, l'ensemble résine-peptide protégé peut subir une méthanolyse pour obtenir le peptide linéaire protégé dans lequel le groupement carboxy à C terminal est méthylé. L'ester méthylique peut ensuite être hydrolysé dans des conditions alcalines modérées pour donner le groupement carboxy à C terminal libre. Les groupements protecteurs de la chaîne peptidique peuvent alors être éliminés par traitement par un acide fort, comme l'acide fluorhydrique liquide. Une technique particulièrement utile pour la méthanolyse est celle de G. Moore et al., Peptides, Proc. 5th Amer. Pept. Symp., M. Goodman et J. Meinhofer, Eds., John Wiley, N.Y., 1977, pp. 518-521, dans laquelle on traite l'ensemble résine-peptide protégé par le méthanol et le cyanure de potassium en présence d'éther-couronne.

Un autre procédé de coupure du peptide protégé et de la résine est l'ammonolyse ou le traitement par l'hydrazine. L'amide ou hydrazide à C terminal résultant peut être hydrolysé en groupement carboxy libre à C terminal, et les groupements protecteurs peuvent être ensuite éliminés de façon classique.

On verra également que le groupement protecteur présent sur le groupement α -amino à N-terminal peut être éliminé préférentiellement avant ou après que les peptides protégés ne soient coupés du support de résine.

Par coupure de la résine et élimination de tous les groupements protecteurs, le produit obtenu est sous forme d'un tétradécapeptide linéaire. Le tétradécapeptide linéaire peut être cyclisé pour obtenir le tétradécapeptide cyclique final de formule (III), à l'aide d'un agent oxydant pouvant transformer les groupements sulfhydryle de Cys³ et Cys¹⁴ en liaison disulfure. L'exposition à l'air ou le traitement par le ferricyanure de potassium peuvent être utilisés pour effectuer cette oxydation. Quand on utilise l'air, le pH du milieu doit être environ 2,5 à environ 9,0, et de préférence environ 7,0 - 7,6, et la concentration du peptide ne doit pas être supérieure à 0,4 mg/ml. On préfère une concentration d'environ 50 µg/ml.

Pour les besoins pharmacologiques, les peptides de cette invention peuvent être administrés sous forme d'un sel d'addition d'acide préparé par réaction avec un acide minéral ou organique approprié qui soit non toxique et acceptable pour les besoins pharmaceutiques. Les acides appropriés sont bien connus dans le domaine. Des exemples de ces acides sont les acides chlorhydrique, bromhydrique, sulfurique, sulfonique, tartrique, fumarique, glycolique, succinique, malonique, citrique, maléique, acétique, phosphorique, benzoïque, ascorbique, nitrique, p-toluènesulfonique, benzènesulfonique, naphthalènesulfonique, propionique, etc .. L'acide acétique est préféré.

Le procédé préféré de synthèse en phase solide des peptides de formule (III) et de leurs intermédiaires est illustré dans les Exemples. Dans ce procédé, on fixe d'abord une cystéine à groupement α -amino et sulfhydryle protégé (Boc-Cys(MBzl)-OH) à une résine de polystyrène chlorométhylé selon la méthode de B. Gisin, Helv. Chim. Acta. 56, 1476 (1173) dans laquelle on fait réagir le sel de césium de la cystéine protégée avec la résine de polystyrène chlorométhylé dans le diméthylformamide. Puis on enlève le groupe-ment protecteur t-butyloxycarbonyle par traitement par l'acide trifluoroacétique dans un mélange chloroforme/chlorure de méthylène. On copule ensuite des amino-acides protégés distincts en commençant séquentiellement à la cystéine à C terminal sur support de résine jusqu'à ce que l'on obtienne

le tétradécapeptide désiré. Pendant toute la synthèse, on utilise comme agent de copulation le N,N'-dicyclohexylcarbodiimide, et l'on utilise le groupement t-butyloxy-carbonyle (Boc) comme groupement protecteur du groupement α -amino. Les groupements protecteurs sur la chaîne latérale sont : le groupement p-méthoxybenzyle (MBzl) pour le groupement sulfhydryle de la cystéine ; le groupement o-chlorobenzoyloxy-carbonyle (Clz) pour le groupement ϵ -amino de la lysine ; et le groupement benzyle (Bzl) pour le groupement hydroxy de la sérine et de thréonine. On utilise l'acide trifluoroacétique dans le chlorure de méthylène pour éliminer préférentiellement le groupement protecteur t-butyloxy-carbonyle. Après chaque déprotection, on neutralise avec de la triéthylamine le peptide à chaîne latérale protégée.

Une fois la séquence désirée d'acides aminés achevée, on effectue la déprotection du tétradécapeptide résultant et on l'élimine de la résine de polystyrène, par traitement par l'acide fluorhydrique liquide en présence d'anisole et d'éthylmercaptan. Le tétradécapeptide linéaire résultant de formule (IV) est facilement transformé en tétradécapeptide cyclique (V) par exposition d'une solution du tétradécapeptide linéaire (IV) à l'oxygène atmosphérique. On purifie le tétradécapeptide cyclique par chromatographie en utilisant une colonne de Sephadex G-25 Fine.

Pour l'utilisation pharmacologique, les tétradécapeptides de formule (III) peuvent être administrés seuls ou en combinaison avec des supports ou excipients pharmaceutiquement acceptables. Les supports pharmaceutiques appropriés seront évidents pour l'homme de l'art. L'administration peut se faire par voie orale ou parentérale par des procédés classiques dans le domaine.

Les abréviations suivantes ont été utilisées dans la description :

DMF = diméthylformamide
 BOC = N-t-butyloxy-carbonyle
 Ala = alanine
 Gly = glycine
 Val = valine
 Leu = leucine

- Phé = phénylalanine
 Cha = cyclohexylalanine
 Cys = cystéine
 Lys = lysine
 5 Trp = tryptophane
 sér = sérine
 Thr = thréonine
 t-BuOH = alcool t-butylique
 t-AmOH = alcool t-amylque
 10 CHCl₃ = chloroforme
 CH₂Cl₂ = chlorure de méthylène
 GH = hormone de croissance
 S.C. = sous-cutanée
 I.P. = intrapéritonéale
 15 I.V. = intraveineuse

La préparation et l'utilisation des peptides de l'invention sont illustrées dans les exemples suivants.

Exemple 1

20 Ester de résine hydroxyméthyl-polystyrène de la N-t-butyloxy-carbonyl-L-(S-p-méthoxybenzyl)cystéine

On estérifie la résine de polystyrène chlorométhylée selon le procédé de F. Gisin, Helv. Chim. Acta., 56, 1976 (1973).

On agite une solution du sel de césium de la t-butyl-oxycarbonyl-L-(S-p-méthoxybenzyl)cystéine (51,26 mmoles) dans 25 1000 ml de diméthylformamide (DMF) avec 100 g (0,75 mmole de chlore/gramme) de résine de polystyrène chlorométhylée (Lab Systems, Inc.) à la température ambiante pendant 5 jours. On sépare la résine par filtration et on la lave avec un 30 mélange de 85 % de DMF et 15 % d'eau puis avec du DMF seul. On répète cette séquence de lavage deux fois supplémentaires. Après deux lavages supplémentaires avec le DMF, on met la résine en suspension dans du DMF (1000 ml), et on agite la suspension avec 16 g (83,4 mmoles) d'acétate de césium à la 35 température ambiante pendant neuf jours. On sépare la résine par filtration et on la lave avec un mélange à 85 % de DMF et 15 % d'eau puis avec du DMF seul. On répète cette séquence deux fois supplémentaires. On lave enfin la résine avec du chloroforme et on la met en suspension dans du chloroforme

contenu dans une ampoule à décanter. On enlève les fines en soutirant le liquide. On répète cette séparation trois fois supplémentaires. On recueille la résine par filtration et on la lave successivement avec de l'éthanol à 95 %, du benzène et de l'éthanol à 95 %. On répète ces deux derniers lavages deux fois supplémentaires. On sèche la résine pendant une nuit sous vide à 30°C, ce qui donne 115,3 g du produit cité en titre. On titre une portion de la résine pour déterminer la cystéine, après hydrolyse, en utilisant un mélange 1:1 d'acide chlorhydrique concentré et de dioxanne en présence d'une petite quantité de diméthylsulfoxyde. Valeur trouvée : 0,254 mmole de cystéine par gramme de résine.

Exemple 2

Ester de résine hydroxyméthyl-polystyrène de la N-t-butyloxy-carbonyl-D-valyl-glycyl-L-(S-p-méthoxybenzyl)cystéinyl-L-(N^ε-o-chlorobenzoyloxycarbonyl)lysyl-L-alanyl-D-phénylalaninyl-L-phénylalaninyl-D-tryptophyl-L-(N^ε-o-chlorobenzoyloxycarbonyl)-lysyl-L-(O-benzyl)thréoninyl-D-phénylalaninyl-L-(O-benzyl)-thréoninyl-L-(O-benzyl)séryl-L-(S-p-méthoxybenzyl)cystéine

On place 5,0 g d'ester de résine hydroxyméthyl-polystyrène de la N-t-butyloxy-carbonyl-L-(S-p-méthoxybenzyl)-cystéine, préparé dans l'Exemple 1, dans la chambre de réaction d'un appareil de synthèse de peptides Beckman 990, et on le traite selon le programme A (voir ci-dessous), en utilisant de la N-t-butyloxy-carbonyl-L-(O-benzyl)sérine comme amino-acide ajouté dans son étape 11. Après le lavage final au chlorure de méthylène (Etape 18), on lave le produit trois fois avec du DMF et on le copule à nouveau en suivant l'étape 11 du programme A. Puis on lave le produit trois fois avec du DMF et on le retraits en suivant les étapes 12 à 18 du programme A.

D'une manière similaire, on incorpore les amino-acides protégés suivants successivement dans l'ensemble peptide-résine :

N-t-butyloxy-carbonyl-L-(O-benzyl)thréonine
 N-t-butyloxy-carbonyl-D-phénylalanine
 N-t-butyloxy-carbonyl-L-(O-benzyl)thréonine
 N-t-butyloxy-carbonyl-L-(N^ε-o-chlorobenzoyloxycarbonyl)-lysine

N-t-butyloxycarbonyl-D-tryptophane

N-t-butyloxycarbonyl-L-phénylalanine

N-t-butyloxycarbonyl-D-phénylalanine

N-t-butyloxycarbonyl-L-alanine*

5 N-t-butyloxycarbonyl-L-(N^ε-o-chlorobenzoyloxycarbonyl)-
lysine

N-t-butyloxycarbonyl-L-(S-p-méthoxybenzyl)cystéine

N-t-butyloxycarbonyl-glycine

N-t-butyloxycarbonyl-D-valine.

10 * On ne répète pas les étapes 10 à 18 du programme A pendant
l'incorporation de BOC-Ala.

Après incorporation du reste amino-acide à N-terminal
(D-valine), on sèche sous vide l'ensemble peptide-résine.
L'analyse des amino-acides (obtenue en chauffant à reflux
15 une portion du peptide pendant 72 heures dans un mélange 1:1
d'acide chlorhydrique concentré et de dioxanne) donne les
résultats suivants, la lysine étant utilisée comme référence:
2Thr, 2,20 ; Sér, 1,17 ; Gly, 0,99 ; Ala, 1,13 ; Val, 1,06 ;
3Phé, 3,18 ; 2Lys, 2,00.

20 PROGRAMME A [Programme de l'élimination du groupement pro-
tecteur t-butyloxycarbonyl du groupement α-amino et copulation
de l'acide-amino à l'ensemble peptide-résine]

1. Laver avec CHCl₃, trois fois.

2. Pour enlever le groupement protecteur t-butyloxy-
25 carbonyl, traiter par un mélange d'acide trifluoroacétique
(28,8 %), de CH₂Cl₂ (17,5 %) et de triéthylsilane (5,8 %)
pendant 20 minutes. Répéter une fois.

3. Laver avec CHCl₃, deux fois.

4. Laver avec CH₂Cl₂, une fois.

30 5. Laver avec un mélange de 90 % de t-BuOH et de 10 %
de t-AmOH, trois fois.

6. Laver avec CH₂Cl₂, trois fois.

7. Pour neutraliser, traiter avec 3 % de triéthylamine
dans CH₂Cl₂, trois fois.

35 8. Laver avec CH₂Cl₂, trois fois.

9. Laver avec un mélange de 90 % de t-BuOH et de 10 %
de t-AmOH, trois fois.

10. Laver avec CH₂Cl₂, trois fois.

11. Pour copuler l'acide-amino, traiter par l'acide-

acide protégé (1,0 mmole/gramme de résine) et par du N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (1,0 mmole/gramme de résine) dans CH_2Cl_2 . Laisser une durée de réaction de 2 heures.

12. Laver avec CH_2CH_2 , trois fois.
- 5 13. Laver avec un mélange de 90 % de t-BuOH et 10 % de t-AmOH.
14. Laver avec CH_2Cl_2 , trois fois.
15. Pour neutraliser, traiter par 3 % de triéthylamine dans CH_2Cl_2 , trois fois.
- 10 16. Laver avec CH_2Cl_2 , trois fois.
17. Laver avec un mélange à 90 % de t-BuOH et 10 % de t-AmOH, trois fois.
18. Laver avec CH_2Cl_2 , trois fois.

Dans chaque étape, le volume de solvant utilisé est 8 ml/g de résine. A moins d'indication contraire, la durée de contact pour chaque étape est de 3 minutes.

Exemple 3

D-valyl-glycyl-L-cystéinyl-L-lysyl-L-alanyl-D-phénylalanyl-L-phénylalanyl-D-tryptophyl-L-lysyl-L-thréonyl-D-phénylalanyl-L-thréonyl-L-séryl-L-cystéine

On mélange l'ensemble peptide protégé-résine préparé dans l'Exemple 2 (3,505 g, à un taux de substitution de 0,157 mmole/g de résine) avec 6,4 ml d'anisole et 6,4 ml d'éthylmercaptan. On refroidit le mélange dans l'azote liquide et on ajoute par distillation 72 ml d'acide fluorhydrique liquide. Puis on porte le mélange à 0°C et on l'agite pendant deux heures. L'élimination de l'acide fluohydrique par distillation donne un résidu auquel on ajoute de l'éther à 0°C. On recueille le solide, on le lave avec de l'éther et on le sèche. On sépare le peptide de la résine en extrayant le solide avec de l'acide acétique 1M et de l'acide acétique à 50 %. On lyophilise l'extrait à l'obscurité, jusqu'à siccité. On ajoute à la substance sèche un mélange de 10 ml d'acide acétique 0,2 M et de 4 ml d'acide acétique glacial, et on chauffe la suspension pour effectuer la dissolution. Par refroidissement, il se sépare une petite quantité de précipité que l'on enlève par filtration. On chromatographie le filtrat sur une colonne de Sephadex G-25 Fine dans les conditions suivantes ; solvant : acide acétique 0,2 M

dégazé ; dimensions de la colonne : 7,5 x 150 cm ;
température : 26°C ; débit : 1626 ml/h ; volume des fractions :
24,4 ml.

Un diagramme de l'absorbance à 280 m μ de chaque frac-
5 tion en fonction du numéro de la fraction indique un pic
large avec un épaulement sur le côté arrière. L'analyse
spectrographique par UV indique que les fractions représen-
tées par le pic large contiennent le produit désiré. On
combine donc les fractions 214-235 (5196-5706 ml, pic à
10 5475 ml). L'analyse spectrographique par UV d'un échantillon
des fractions réunies indique que l'on a obtenu 342 ml de
produit. Récupération : 38,3 %. Teneur en groupements
sulfhydryle libre : 89,8 % de la valeur théorique (par le
titrage d'Ellman.

15 Exemple 4

Disulfure cyclique (3 + 14) de la D-valyl-glycyl-L-cystéinyl-
L-lysyl-L-alanyl-D-phénylalaninyl-L-phénylalaninyl-D-tryptophyl-
L-lysyl-L-thréoninyl-D-phénylalaninyl-L-thréoninyl-L-séryl-L-
cystéine

20 On oxyde à l'air le peptide linéaire préparé dans
l'Exemple 3 pour obtenir le peptide cyclique correspondant,
en utilisant le mode opératoire suivant :

On dilue les fractions réunies dans l'Exemple 3
(510 ml, contenant théoriquement 342 mg de peptide) avec
25 6330 ml d'eau distillée pour obtenir une solution finale
ayant une concentration de 50 μ g/ml. On ajoute suffisamment
d'hydroxyde d'ammonium concentré pour amener le pH à 6,7.
Puis on agite la solution à la température ambiante à l'obs-
curité pendant 41 heures, moment auquel un titrage Ellman
30 d'une partie aliquote indique une oxydation totale.

On concentre la solution sous vide à un volume
d'environ 30 ml. On ajoute 30 ml d'acide acétique glacial
et on dessale la solution par chromatographie sur une colonne
de Sephadex G-25 Fine dans les conditions suivantes :
35 solvant : acide acétique à 50 % dégazé ; dimensions de la
colonne : 5,0 x 210 cm ; température : 26°C ; débit : 113 ml/
heure ; volume des fractions : 19,8 ml.

Un diagramme de l'absorbance à 280 m μ de chaque frac-
tion en fonction du numéro de la fraction indique deux pics

importants. Le premier représente les formes agglomérées du peptide alors que le second représente la substance monomère. On réunit les fractions 106-114 (2080-2257 ml) et on lyophilise à siccité à l'obscurité. On dissout le solide résultant dans de l'acide acétique 0,2M dégazé (20 ml) et on chromatographie la solution sur une colonne de Sephadex G-25 Fine dans les conditions suivantes : solvant : acide acétique 0,2M dégazé ; dimensions de la colonne : 5,0 x 150 cm ; température : 26°C ; débit : 450 ml/heure ; volume des fractions : 15,75 ml.

Un diagramme de l'absorbance à 280 m μ de chaque fraction en fonction du numéro de la fraction indique un seul pic. Une analyse spectrographique par UV indique que les fractions représentées par la partie principale de ce pic contiennent le produit désiré. On réunit les fractions 171-181 (2678-2855 ml ; pic à 2750 ml) et on les lyophilise à l'obscurité pour obtenir le peptide cité en titre. Une analyse spectrographique par UV des fractions réunies, avant lyophilisation, indique que l'on a obtenu 92 ml de produit. Récupération : 26,9 % (à partir de la forme linéaire). Analyse des aminoacides :

D-Val, 1,0 ; Gly, 1,07 ; Cys, 2,08 ; Lys, 2,0 ; Ala, 1,02 ; D- et L-Phé, 2,85 ; D-Trp, 1,68 ; Thr, 0,91 ; Sér, 0,87.

Les résultats précédents sont exprimés comme des rapports à Lys/2. Toutes les valeurs sont des moyennes de 2 hydrolyses sans addition d'agents de fixation. La valeur pour D-Trp est déterminée par analyse spectrographique UV en fonction de la concentration de la solution utilisée pour l'analyse.

30 Exemple 5

Ester de résine hydroxyméthyl-polystyrène de la N-t-butyl-oxycarbonyl-D-valyl-glycyl-L-(S-p-méthoxybenzyl)cystéinyl-L-(N^c-o-chlorobenzoyloxycarbonyl)lysyl-L-alanyl-L-phénylalanyl-L-phénylalanyl-D-tryptophyl-L-(N^c-o-chlorobenzoyloxycarbonyl)-lysyl-D-(O-benzyl) thréonyle-D-phénylalanyl-L-(O-benzyl)-thréonyle-L-(O-benzyl) séryl-L-(S-p-méthoxybenzyl)cystéine

On place 5,0 g d'ester de résine hydroxyméthyl-polystyrène de la N-t-butylloxycarbonyl-L-(S-p-méthoxybenzyl)-cystéine, tel que préparé dans l'Exemple 1, dans la chambre

de réaction d'un appareil de synthèse de peptides Beckman 990 et on le traite selon le Programme A défini dans l'Exemple 2, en utilisant de la N-t-butyloxycarbonyl-L-(O-benzyl)sérine comme amino-acide ajouté dans l'étape 11. Après le lavage
 5 au chlorure de méthylène (étape 18), on lave le produit trois fois avec du DMF et on le copule à nouveau en suivant l'étape 11 du Programme A. Puis, on lave le produit trois fois avec le DMF et on le traite à nouveau en suivant les étapes 12 à 18 du Programme A.

10 D'une manière similaire, on incorpore les amino-acides protégés suivants, séquentiellement dans l'ensemble peptide-résine :

N-t-butyloxycarbonyl-L-(O-benzyl) thréonine
 N-t-butyloxycarbonyl-D-phénylalanine
 15 N-t-butyloxycarbonyl-L-(O-benzyl) thréonine
 N-t-butyloxycarbonyl-L-(N^ε-o-chlorobenzoyloxycarbonyl)-lysine
 N-t-butyloxycarbonyl-D-tryptophane
 N-t-butyloxycarbonyl-L-phénylalanine
 20 N-t-butyloxycarbonyl-L-phénylalanine
 N-t-butyloxycarbonyl-L-alanine*
 N-t-butyloxycarbonyl-L-(N^ε-o-chlorobenzoyloxycarbonyl)-lysine
 N-t-butyloxycarbonyl-L-(S-p-méthoxybenzyl) cystéine
 25 N-t-butyloxycarbonyl-glycine
 N-t-butyloxycarbonyl-D-valine

* On ne répète pas les étapes 11 à 18 du Programme A pendant l'incorporation de BOC-Ala.

Après incorporation du reste amino-acide à N-terminal
 30 (D-valine), on sèche sous vide l'ensemble peptide-résine. L'analyse des amino-acides (obtenue en chauffant une portion du peptide à reflux pendant 72 heures dans un mélange 1:1 d'acide chlorhydrique concentré et de dioxanne) donne les résultats suivants, la lysine étant utilisée comme référence:
 35 2Thr, 2,12 ; Sér, 1,09 ; Gly, 0,95 ; Ala, 1,13 ; Val, 0,98 ;
 3Phé, 3,09 ; 2Lys, 2,00.

Exemple 6

D-valyl-glycyl-L-cystéinyl-L-lysyl-L-alanyl-L-phénylalananyl-L-phénylalananyl-D-tryptophyl-L-lysyl-L-thréonyl-D-phénylalananyl-L-thréonyl-L-séryl-L-cystéine

5 On mélange l'ensemble peptide protégé-résine préparé dans l'Exemple 5 (3,516 g, à un taux de substitution de 0,151 mmole/g de résine) avec 6,4 ml d'anisole et 6,4 ml d'éthyl-mercaptan. On refroidit le mélange dans de l'azote liquide et on ajoute par distillation 74 ml d'acide fluorhydrique

10 liquide. Puis on porte le mélange à 0°C et on agite pendant deux heures. L'élimination de l'acide fluorhydrique par distillation donne un résidu auquel on ajoute de l'éther à 0°C. On recueille le solide, on le lave à l'éther et on le sèche. On sépare les peptides de la résine en extrayant le

15 solide avec de l'acide acétique 1M et de l'acide acétique à 50 %. On lyophilise l'extrait à l'obscurité à siccité. On ajoute au matériau sec un mélange de 10 ml d'acide acétique 0,2M et de 4 ml d'acide acétique glacial et on chauffe la suspension pour effectuer la solution. On enlève par fil-

20 tration les matériaux insolubles en utilisant 6 ml supplémentaires d'acide acétique glacial. On chromatographie le filtrat sur une colonne de Séphadex G-25 Fine dans les conditions suivantes : solvant : acide acétique 0,2M dégazé ; dimensions de la colonne : 7,5 x 150 cm ; température : 26°C ;

25 débit : 1566 ml/heure ; volume des fractions : 23,5 ml.

Un diagramme de l'absorbance à 280 m μ de chaque fraction en fonction du numéro de la fraction indique un pic large avec un épaulement de la partie arrière. Une analyse spectrographique par UV indique que les fractions

30 représentées par le pic large contiennent le produit désiré. On combine donc les fractions 219-245 (5123-5773 ml, pic à 5480 ml). L'analyse spectrographique par UV d'un échantillon des fractions réunies indique que l'on a obtenu 457 ml de produit. Récupération : 53,0 % ; teneur en groupement

35 sulfhydryle libre : 92 % de la valeur théorique (par titrage d'Ellman).

Exemple 7

Disulfure cyclique (3 → 14) de la D-valyl-glycyl-L-cystéinyl-L-lysyl-L-alanyl-L-phénylalaninyl-L-phénylalaninyl-D-tryptophyl-L-lysyl-L-thréoninyl-D-phénylalaninyl-L-thréoninyl-L-séryl-L-

5 cystéine

On oxyde à l'air les peptides linéaires préparés dans l'Exemple 6 pour obtenir le peptide cyclique correspondant, selon le mode opératoire suivant :

On dilue les fractions réunies obtenues dans l'Exemple 10 3 (650 ml, contenant théoriquement 457 ml de peptide) avec 8476 ml d'eau distillée pour obtenir une solution finale à une concentration de 50 µg/ml. On ajoute suffisamment d'hydroxyde d'ammonium concentré pour amener le pH à 6,7. Puis on agite la solution à la température ambiante à l'obs- 15 curité pendant 24 heures, après quoi un titrage Ellman d'une partie aliquote indique une oxydation complète.

On concentre la solution sous vide à un volume d'environ 50 ml. On ajoute 50 ml d'acide acétique glacial et on dessale la solution par chromatographie sur une colonne de 20 Séphadex G-25 Fine dans les conditions suivantes ; solvant : acide acétique à 50 % dégazé ; dimensions de la colonne : 5,0 x 210 cm ; température : 26°C ; débit : 120 ml/heure ; volume des fractions: 21 ml.

Un diagramme de l'absorbance à 280 mµ de chaque frac- 25 tion en fonction du numéro de la fraction indique deux grands pics. Le premier représente les formes agglomérées du peptide tandis que le second représente la substance monomère.

On réunit les fractions 99-116 (2069)2446 ml) et on les lyophilise à siccité à l'obscurité. On dissout le solide 30 résultant dans 20 ml d'acide acétique 0,2M dégazé et on chromatographie la solution sur une colonne de Séphadex G-25 Fine dans les conditions suivantes : acide acétique dégazé 0,2M ; dimensions de la colonne : 5,0 x 150 cm ; température: 26°C ; débit : 446 ml/heure ; volume des fractions : 15,6 ml.

35 Un diagramme de l'absorbance à 280 mµ de chaque fraction en fonction du numéro de la fraction indique un seul pic. L'analyse spectrographique UV indique que les fractions représentées par la partie principale de ce pic contiennent le produit désiré. On réunit les fractions 167-179 (2590-

2796 ml ; pic à 2680 ml) et on les lyophilise à l'obscurité pour obtenir le peptide cité en titre. L'analyse spectrographique UV des fractions réunies, avant lyophilisation, indique que l'on a obtenu 182 ml de produit. Récupération :

5 39,8 % (par rapport à la forme linéaire).

Analyse des amino-acides :

D-val, 1,0 ; Gly, 1,0 ; Cys, 1,52 ; Lys, 2,0 ; Ala, 1,03 ;
D- et L-phé, 2,94 ; D-Trp, 1,04 ; Thr, 1,98 ; Sér, 0,84

10 Les résultats précédents sont exprimés sous forme de rapport à Lys/2. Toutes les valeurs sont les moyennes de deux hydrolyses, sans addition d'agents de fixation. La valeur pour D-Trp est déterminée par analyse spectrographique UV basée sur la concentration de la solution utilisée pour l'analyse.

15 Exemple 8

Ester de résine hydroxyméthyl-polystyrène de la N-t-butyloxy-carbonyl-D-valyl-glycyl-L-(S-p-méthoxybenzyl)cystéinyl-L-(N^ε-o-chlorobenzoyloxycarbonyl)lysyl-L-alanyl-L-leucyl-L-phényl-alanyl-D-tryptophyl-L-(N^ε-o-chlorobenzoyloxycarbonyl)lysyl-L-
20 (O-benzyl)thréonyl-D-phénylalaninyl-L-(O-benzyl)thréonyl-L-(O-benzyl)séryl-L-(S-p-méthoxybenzyl)cystéine

On place 5,0 g d'ester de résine hydroxyméthyl-polystyrène de la N-t-butyloxy-carbonyl-L-(S-p-méthoxybenzyl)-cystéine, tel que préparé dans l'Exemple 1, dans la chambre
25 de réaction d'un appareil de synthèse de peptides Beckman 990 et on le traite selon le Programme A décrit dans l'Exemple 2, en utilisant la N-t-butyloxy-carbonyl-L-(O-benzyl)sérine comme amino-acide ajouté dans l'étape 11. Après le lavage final au chlorure de méthylène (Etape 18), on lave le produit trois
30 fois avec du DMF et on le copule à nouveau en suivant l'étape 11 du Programme A. On lave ensuite le produit trois fois avec du DMF et on le traite à nouveau en suivant les étapes 12 à 18 du Programme A.

D'une manière similaire, on incorpore les amino-acides
35 protégés suivants, séquentiellement dans l'ensemble peptide-résine :

N-t-butyloxy-carbonyl-L-(O-benzyl)thréonine

N-t-butyloxy-carbonyl-D-phénylalanine

N-t-butyloxy-carbonyl-D-(O-benzyl)thréonine

N-t-butyloxycarbonyl-L-(N^ε-o-chlorobenzoyloxycarbonyl)-
lysine

N-t-butyloxycarbonyl-D-tryptophane

N-t-butyloxycarbonyl-L-phénylalanine

5 N-t-butyloxycarbonyl-L-leucine

N-t-butyloxycarbonyl-L-alanine*

N-t-butyloxycarbonyl-L-(N^ε-o-chlorobenzoyloxycarbonyl)-
lysine

N-t-butyloxycarbonyl-L-(S-p-méthoxybenzyl)cystéine

10 N-t-butyloxycarbonyl-glycine

N-t-butyloxycarbonyl-D-valine

* On ne répète pas les étapes 11 à 18 du Programme A pendant
l'incorporation de BOC-Ala.

Après incorporation du reste amino-acide à N-terminal
15 (D-valine), on sèche sous vide l'ensemble peptide-résine.

L'analyse des amino-acides (obtenue en chauffant une portion
du peptide à reflux pendant 72 heures dans un mélange 1:1
d'acide chlorhydrique concentré et de dioxanne) donne les
résultats suivants, la lysine étant utilisée comme référence:
20 2Thr, 1,88 ; Sér, 1,22 ; Gly, 1,06 ; Ala, 1,17 ; Val, 1,05 ;
Leu, 1,17 ; 2Phé, 2,24 ; 2Lys, 2,00.

Exemple 9

D-valyl-glycyl-L-cystéinyl-L-lysyl-L-alanyl-L-leucyl-L-
phénylalananyl-D-tryptophyl-L-lysyl-L-thréonyl-D-phénylalananyl-
25 L-thréonyl-L-séryl-L-cystéine

On mélange l'ensemble peptide protégé-résine préparé
dans l'Exemple 8 (3,506 g, à un taux de substitution de
0,160 mmole/g de résine) avec 6,4 ml d'anisole et 6,4 ml
d'éthylmercaptan. On refroidit le mélange avec de l'azote
30 liquide et on ajoute par distillation 74 ml d'acide fluorhy-
drique liquide. Puis on porte le mélange à 0°C et on l'agite
pendant deux heures. L'élimination de l'acide fluorhydrique
par distillation donne un résidu auquel on ajoute de l'éther
à 0°C. On recueille le solide, on lave avec de l'éther et
35 on le sèche. On sépare le peptide de la résine en extrayant
le solide avec de l'acide acétique 1M et de l'acide acétique
à 50 %. On lyophilise l'extrait à siccité à l'obscurité. On
ajoute au matériau sec un mélange de 10 ml d'acide acétique
0,2M et de 4 ml d'acide acétique glacial et on chauffe la

suspension pour effectuer la dissolution. On chromatographie le filtrat sur une colonne Séphadex G-25 Fine dans les conditions suivantes : solvant : acide acétique 0,2M dégazé ; dimensions de la colonne : 7,5 x 150 cm ; température : 26°C ;
5 débit : 1640 ml/heure ; volume des fractions : 24,6 ml.

Un diagramme de l'absorbance à 280 m μ de chaque fraction en fonction du numéro de la fraction indique un grand pic avec un épaulement du côté avant et un pic arrière. L'analyse spectrographique UV indique que les fractions représentées par le pic contiennent le produit désiré. On réunit
10 donc les fractions 214-233 (5240-5728 ml, pic à 5500 ml). Une analyse spectrographique UV d'un échantillon des fractions réunies indique que l'on a obtenu 426 mg de produit. Récupération : 47,8 % ; teneur en groupements sulfhydryle libre :
15 96,0 % de la valeur théorique (par titrage d'Ellman).

Exemple 10

Disulfure cyclique (3 + 14) de la D-valyl-glycyl-L-cystéinyl-L-lysyl-L-alanyl-L-leucyl-L-phénylalanyl-D-tryptophyl-L-lysyl-L-thréonyl-D-phénylalanyl-L-thréonyl-L-séryl-L-cystéine

20 On oxyde à l'air les peptides linéaires préparés dans l'Exemple 9 pour obtenir le peptide cyclique correspondant, selon le mode opératoire suivant :

On dilue les fractions réunies obtenues dans l'Exemple 9 (488 ml, contenant théoriquement 426 mg de peptide) avec
25 8032 ml d'eau distillée pour obtenir une solution finale ayant une concentration de 50 μ g/ml. On ajoute suffisamment d'hydroxyde d'ammonium concentré pour porter le pH à 6,7. Puis, on agite la solution à la température ambiante à l'obscurité pendant 64 heures, moment auquel un titrage d'Ellman
30 d'une partie aliquote indique une oxydation complète.

On concentre la solution sous vide à un volume d'environ 27 ml. On ajoute 28 ml d'acide acétique glacial et on dessale la solution par chromatographie sur une colonne Séphadex G-25 Fine dans les conditions suivantes :
35 solvant : acide acétique à 50 % dégazé ; dimensions de la colonne : 5,0 x 210 cm ; température : 26°C ; débit : 116 ml par heure ; volume des fractions : 20,3 ml.

Un diagramme de l'absorbance à 280 m μ de chaque fraction en fonction du numéro de la fraction indique deux pics

importants. Le premier représente les formes agglomérées du peptide et le second représente la substance monomère. On réunit les fractions 105-115 (2109-2330 ml) et on les lyophilise à siccité à l'obscurité. On dissout le solide résultant dans 20 ml d'acide acétique 0,2M dégazé et on chromatographie la solution sur une colonne de Séphadex G-25 Fine dans les conditions suivantes : Solvant : acide acétique 0,2M dégazé ; dimensions de la colonne : 5,0 x 150 cm ; température : 26°C ; débit : 458 ml/h ; volume des fractions : 16,0 ml.

10 Un diagramme de l'absorbance à 280 m μ de chaque fraction en fonction du numéro de la fraction indique un seul pic. Une analyse spectrographique UV indique que les fractions représentées dans la partie principale de ce pic comprennent le produit désiré. On réunit les fractions 159-167 (2534-
15 2678 ml ; pic à 2622 ml) et on les lyophilise à l'obscurité pour obtenir le peptide cité en titre. L'analyse spectrographique UV des fractions réunies avant lyophilisation indique que l'on a obtenu 135 ml de produit. Récupération : 31,7 % (par rapport à la forme linéaire).

20 Analyse des amino-acides :

D-Val, 1,01 ; Gly, 1,0 ; Cys, 1,56 ; Lys, 2,0 ; Ala, 1,02 ;
Leu, 1,02 ; D- et L-Phé, 2,0 ; D-Trp, 1,11 ; Thr, 1,94 ;
Sér, 0,85.

Les résultats précédents sont exprimés comme des rapports à Lys/2. Toutes les valeurs sont les moyennes de deux hydrolyses, sans addition d'agents de fixation. La valeur pour D-Trp est déterminée par analyse spectrographique UV par rapport à la concentration de la solution utilisée pour l'analyse.

30 Exemple 11

Ester de résine hydroxyméthyl-polystyrène de la N-t-butyloxy-carbonyl-L-(S-p-méthoxybenzyl)cystéine

On estérifie une résine de polystyrène chlorométhylée selon le procédé de F. Gisin, Helv. Chim. Acta. 56, 1976
35 (1973).

On agite une solution du sel de césium de la t-butyl-oxycarbonyl-L-(S-p-méthoxybenzyl)cystéine (26,5 mmoles) dans 500 ml de DMF avec 51 g (0,75 mmole de Cl/g) de résine de polystyrène chlorométhylée (Lab Systems, Inc.) à la tempéra-

ture ambiante pendant six jours. On sépare la résine par filtration et on la lave trois fois avec un mélange de 90 % de DMF et 10 M d'eau, trois fois avec de l'éthanol à 95 %, puis trois fois avec du DMF seul. On met la résine en suspension dans 500 ml de DMF et l'on agite la suspension avec 10,5 g d'acétate de césium à la température ambiante pendant six jours. On sépare la résine par filtration et on la lave une fois avec du DMF aqueux. Puis, on la lave trois fois avec chacun des solvants suivants : mélange à 90 % de DMF et 10 % d'eau ; éthanol à 95 % ; chlorure de méthylène et chloroforme. On met la résine en suspension dans du chloroforme contenu dans une ampoule à décantier. On élimine les fines en soutirant le liquide. On répète cette séparation trois fois supplémentaires. On recueille la résine par filtration et on la sèche pendant une nuit sous vide à 40°C, ce qui donne 44,8 g du produit cité en titre. On analyse une partie de la résine pour déterminer la teneur en cystéine, après hydrolyse en utilisant un mélange 1:1 d'acide chlorhydrique concentré et de dioxanne en présence d'une petite quantité de diméthylsulfoxyde.

Valeur trouvée : 0,25 mmole de cystéine par gramme de résine.

Exemple 12

Ester de résine hydroxyméthyl-polystyrène de la N-t-butyloxy-carbonyl-L-alanyl-D-alanyl-L-(S-p-méthoxybenzyl)cystéinyl-L-(N^ε-o-chlorobenzoyloxycarbonyl)lysyl-L-alanyl-L-phénylalanyl-L-phénylalanyl-D-(N-formyl)tryptophyl-L-(N^ε-o-chlorobenzoyloxycarbonyl)lysyl-L-(O-benzyl)thréonyl-D-phénylalanyl-L-(O-benzyl)thréonyl-L-(O-benzyl)séryl-L-(S-p-méthoxybenzyl)cystéine

On place 3,5 g de résine d'hydroxyméthyl-polystyrène de la N-t-butyloxy-carbonyl-L-(S-p-méthoxybenzyl)cystéine, tel que préparé dans l'Exemple 11, dans la chambre de réaction d'un appareil de synthèse de peptides Beckman 990 et on traite selon le Programme A de l'Exemple 2, en utilisant de la N-t-butyloxy-carbonyl-L-(O-benzyl)sérine comme amino-acide utilisé dans l'Etape 11. Après le lavage final au chlorure de méthylène (Etape 18), on lave le produit trois fois avec du diméthylformamide (DMF) et on le copule à nouveau suivant l'Etape 11 du Programme A. Puis on lave le produit trois

fois avec du DMF et on le traite à nouveau en suivant les Etapes 12-18 du Programme A.

D'une manière similaire, on incorpore les amino-acides protégés suivants, séquentiellement dans l'ensemble peptide-

5 résine :

N-t-butyloxycarbonyl-L-(O-benzyl) thréonine

N-t-butyloxycarbonyl-D-phénylalanine

N-t-butyloxycarbonyl-L-(O-benzyl) thréonine

N-t-butyloxycarbonyl-L-(N^ε-o-chlorobenzoyloxycarbonyl)-

10 lysine

N-t-butyloxycarbonyl-D-(N-formyl)-D-tryptophane

N-t-butyloxycarbonyl-L-phénylalanine

N-t-butyloxycarbonyl-L-phénylalanine

N-t-butyloxycarbonyl-L-alanine*

15 N-t-butyloxycarbonyl-L-(N^ε-o-chlorobenzoyloxycarbonyl)-
lysine

N-t-butyloxycarbonyl-L-(S-p-méthoxybenzyl) cystéine

N-t-butyloxycarbonyl-D-alanine

N-t-butyloxycarbonyl-L-alanine

20 * On ne répète pas les Etapes 11-18 du Programme A pendant l'incorporation de BOC-Ala.

Après incorporation du reste amino-acide à N-terminal (L-alanine), on sèche l'ensemble peptide-résine sous vide.

L'analyse des amino-acides (obtenue en chauffant à reflux

25 une portion du peptide pendant 72 heures dans un mélange 1:1 d'acide chlorhydrique concentré et de dioxanne) donne les résultats suivants, la lysine étant utilisée comme référence: 2Thr, 2,64 ; Sér, 1,19 ; 3Ala, 3,96 ; 3Phé, 3,18 ; 2Lys, 2,00; Val, 1,06 ; Trp, 0,85.

30 Exemple 13

L-alanyl-D-alanyl-L-cystéinyl-L-lysyl-L-alanyl-L-phényl-
alanyl-L-phénylalananyl-D-tryptophyl-L-lysyl-L-thréonyl-D-
phénylalananyl-L-thréonyl-L-séryl-L-cystéine

35 On mélange l'ensemble peptide protégé-résine préparé dans l'Exemple 12 (2,831 g à un taux de substitution de 0,160 mmole/g de résine) avec 5,0 ml d'anisole et 5,0 ml d'éthylmercaptan. On refroidit le mélange dans de l'azote liquide et on ajoute par distillation 58 ml d'acide fluorhydrique liquide. Puis on porte le mélange à 0°C et on l'agite

pendant une heure et demie. L'élimination de l'acide fluorhydrique par distillation donne un résidu auquel on ajoute de l'éther à 0°C. On recueille le solide, on le lave avec de l'éther et on le sèche. On sépare le peptide de la
 5 résine en extrayant le solide avec de l'acide acétique 1M et de l'acide acétique glacial. On lyophilise l'extrait à l'obscurité jusqu'à siccité. On ajoute au matériau sec un mélange de 10 ml d'acide acétique 0,2M et de 4 ml d'acide
 10 acétique glacial et l'on chauffe la suspension pour effectuer la dissolution. Le matériau n'est pas complètement soluble. On enlève les substances insolubles par filtration en ajoutant 3 ml d'acide acétique 0,2M. On chromatographie le filtrat sur une colonne de Séphadex G-25 Fine dans les conditions suivantes : solvant : acide acétique 0,2M dégazé ;
 15 dimensions de la colonne : 7,5 x 150 cm ; température : 26°C ; débit : 673 ml/heure ; volume des fractions : 22,8 ml.

Un diagramme de l'absorbance à 280 m μ de chaque fraction en fonction du numéro de la fraction indique un large pic avec un épaulement du côté arrière. Une analyse spectrographique UV indique que les fractions représentées par
 20 le pic large contiennent le produit désiré. On combine donc les fractions 228-252 (5187-5758 ml), pic à 5492 ml). Une analyse spectrographique UV d'un échantillon des fractions réunies indique que l'on a obtenu 262 mg de produit. Récupération : 35,7 % ; teneur en groupements sulfhydryle libre :
 25 82 % de la valeur théorique (par titrage d'Ellman).

Exemple 14

Disulfure cyclique (3 \rightarrow 14) de la L-alanyl-D-alanyl-L-cystéinyl-L-lysyl-L-alanyl-L-phénylalaninyl-L-phénylalaninyl-D-tryptophyl-L-lysyl-L-thréoninyl-D-phénylalaninyl-L-thréoninyl-L-séryl-L-cystéine

On oxyde à l'air le peptide linéaire préparé dans l'Exemple 13 pour obtenir le peptide cyclique correspondant, selon le mode opératoire suivant :

35 On dilue les fractions réunies obtenues dans l'Exemple 13 (571 ml, contenant théoriquement 262 mg de peptide) avec 300 ml d'eau distillée pour obtenir une solution finale ayant une concentration de 51 μ g/ml. On ajoute suffisamment d'hydroxyde d'ammonium concentré pour amener le pH à 6,7.

puis on agite la solution à la température ambiante à l'obscurité pendant 64 heures, après quoi un titrage d'Ellman d'une partie aliquote indique une oxydation complète.

On concentre la solution sous vide jusqu'à un volume
5 d'environ 20 ml. On ajoute 20 ml d'acide acétique glacial et on dessale la solution par chromatographie sur une colonne Séphadex G-25 Fine dans les conditions suivantes : solvant : acide acétique à 50 % dégazé ; dimensions de la colonne : 5,0 x 90 cm ; température : 26°C ; débit : 280 ml/h ; volume
10 des fractions : 16,35 ml.

Un diagramme de l'absorbance à 280 m μ de chaque fraction en fonction du numéro de la fraction indique deux pics importants. Le premier représente les formes agglomérées du peptide et le second représente la substance monomère. On
15 combine les fractions 51-65 (817-1063 ml) et on les lyophilise à siccité à l'obscurité. On dissout le solide résultant dans 15 ml d'acide acétique 0,2M dégazé, et on chromatographie la solution sur une colonne de Séphadex G-25 Fine dans les conditions suivantes : solvant : acide acétique 0,2M dégazé ;
20 dimensions de la colonne : 5,0 x 150 cm ; température : 26°C ; débit : 486 ml/h ; volume des fractions : 17 ml.

Un diagramme de l'absorbance à 280 m μ de chaque fraction en fonction du numéro de la fraction indique un seul pic. L'analyse spectrographique UV indique que les fractions
25 représentées par la partie principale de ce pic contiennent le produit désiré. On réunit les fractions 155-168 (2618-2856 ml ; pic à 2687 ml) et on les lyophilise à l'obscurité pour obtenir le peptide cité en titre. L'analyse spectrographique UV des fractions réunies avant lyophilisation
30 indique que l'on a obtenu 111 mg de produit. Récupération de 42,4 % (à partir de la forme linéaire).

Analyse des amino-acides :

D- et L-Ala, 2,97 ; Cys, 2,0 ; Lys, 2,04 ; D- et L-Phé, 2,88 ;
D-Trp, 0,90 ; Thr, 1,90 ; Sér, 0,80.

35 Les résultats précédents sont exprimés sous forme de rapports à (D- et L-Ala + Lys)/2. Toutes les valeurs sont les moyennes de deux hydrolyses (avec agents de fixation diméthylsulfoxyde et acide thioglycolique) sauf pour D-Trp, Phé, D-Phé, Sér (avec seulement utilisation d'acide

thioglycolique) et Cys (avec seulement diméthylsulfoxyde).

Exemple 15

Les effets des tétradécapeptides de Formule (III) sur l'inhibition de la sécrétion de l'hormone de croissance, de l'insuline et du glucagon peuvent être démontrés par les modes opératoires d'essais suivants :

A. Inhibition de l'hormone de croissance chez les rats :

Cet essai est une modification de la méthode de P. Brazeau et al., Endocrinology, 94, 184 (1974). On sépare des rats mâles (pesant 100-110 g) en trois groupes de huit rats chacun. On administre à chaque rat du pentobarbital sodique à une dose de 4 mg/rat (I.P.) pour stimuler la sécrétion de l'hormone de croissance. Simultanément, un groupe de rats reçoit le composé d'essai (S.C.) ; le second groupe reçoit de la somatostatine (S.C.) et le troisième groupe (témoin) reçoit du sérum physiologique (S.C.). Vingt minutes après, on décapite les animaux et on recueille le sang. On détermine la concentration de l'hormone de croissance dans le sérum par dosage radioimmunologique. On détermine la concentration moyenne en hormone de croissance (\pm l'écart-type) pour chaque groupe. Le pourcentage d'inhibition de la libération de l'hormone de croissance (par rapport aux témoins ayant reçu le sérum physiologique) est ensuite calculé pour le composé d'essai et pour la somatostatine. Quand on les teste comme décrit précédemment, les peptides des Exemples 4, 7, 10 et 14, qui sont représentatifs des peptides de Formule (III) donne les résultats indiqués ci-dessous dans le Tableau I.

Tableau 1

Inhibition de l'hormone de croissance

Peptide	Dose (mg/kg)	Concentration de l'hormone de croissance dans le sérum moyenne \pm E.T. (mg/ml)	% d'inhibition
A. Exemple 4, (D-Val ¹ , Ala ⁵ , D-Trp ⁸ , D-Phé ¹¹ -somatostatine)	50	31,9 \pm 16,6	68,1
	2	72,1 \pm 27,3	27,9
Somatostatine	50	13,4 \pm 5,4	86,6
	2	113,0 \pm 47,4	0
Sérum physiologique (témoin)	--	100,0 \pm 37,2	--
B. Exemple 7, (D-Val ¹ , Ala ⁵ , D-Trp ⁸ , D-Phé ¹¹ -somatostatine)	50	38,7 \pm 8,9	77,5
	2	94,7 \pm 22,0	45,9
Somatostatine	50	26,5 \pm 8,0	84,9
	2	61,8 \pm 18,3	64,8
Sérum physiologique (témoin)	--	175,0 \pm 99,2	--

Tableau I (suite)

Inhibition de l'hormone de croissance		Concentration de l'hormone de croissance dans le sérum moyenne I. E. T. (mg/ml)	% d'Inhibition
Peptide	Dose (mg/kg)		
A. Exemple 10, (D-Val ¹ , Ala ⁵ , Leu ⁶ , D-Trp ⁸ , D-Phé ¹¹ -somatostatine)	50	93,5 ± 22,6	29,3
	2	82,8 ± 19,6	37,3
Somatostatine	50	13,6 ± 1,7	89,7
	2	145,6 ± 53,5	0
Sérum physiologique (témoin)	--	132,3 ± 27,5	--
B. Exemple 14, (D-Val ² , Ala ⁵ , D-Trp ⁸ , D-Phé ¹¹ -somatostatine)	50	77,8 ± 19,6	53
	2	132,1 ± 69,4	20
Somatostatine	50	12,1 ± 3,0	93
	2	84,1 ± 29,6	49
Sérum physiologique (témoin)	--	164,9 ± 69	--

B. Inhibition de l'insuline et du glucagon sur les chiens

On fait jeûner un chien normal pendant une nuit. On commence une perfusion I.V. du composé d'essai (dissous dans le sérum physiologique). Trente minutes après, on commence
 5 une perfusion supplémentaire de L-alanine (dissoute dans la solution saline) et on poursuit pendant un total de 15 minutes, de sorte que l'on administre une dose totale d'environ 1 mmole de L-alanine par kg de poids corporel. On poursuit la perfusion de composé d'essai pendant 15 minutes supplé-
 10 mentaires.

On prélève périodiquement des échantillons de sang avant (à -20, -10 et -1 minute) et après (5, 10, 15, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 90, 120 et 150 minutes) le début de la per-
 15 fusion du composé d'essai. On détermine par dosage radio-immunologique les concentrations en insuline et en glucagon dans le sérum sanguin. On fait un diagramme des concentra-
 tions du glucagon et de l'insuline en fonction du temps. On compare le diagramme obtenu pour le composé d'essai à des diagrammes obtenus pour la somatostatine et le sérum physio-
 20 logique (témoins) dans des expériences similaires.

La perfusion de L-alanine (en l'absence de somato-
 statine ou de composé d'essai actif) provoque une augmenta-
 tion brutale des concentrations d'insuline et de glucagon dans le sérum. Les concentrations reviennent aux niveaux de
 25 base une fois que l'on a arrêté la perfusion de L-alanine. La perfusion de somatostatine (seule) provoque une diminution des concentrations de base d'insuline et de glucagon dans le sérum. En présence de L-alanine, la somatostatine inhibe
 l'augmentation des concentrations d'insuline et de glucagon
 30 produite par la L-alanine.

Quand on les essaie selon le mode opératoire décrit précédemment, les peptides des Exemples 4, 7, 10 et 14, représentatifs des peptides de Formule (III), ne produisent pas d'inhibition significative de la concentration d'insuline
 35 et de glucagon. Les doses utilisées sont les suivantes :

Exemple 4 : 0,147 µg/kg/mn

Exemple 7 : 0,182 µg/kg/mn

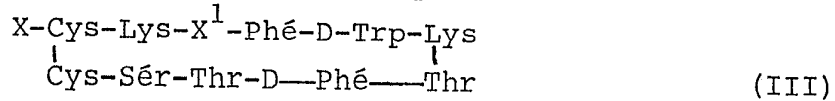
Exemple 10 : 0,247 µg/kg/mn

Exemple 14 : 0,092 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{mn}$; 0,126 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{mn}$;
0,128 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{mn}$; 0,198 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{mn}$;
et 0,305 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{mn}$ (5 doses d'essai).

Les composés de Formule (III) présentent une faible
5 toxicité et conviennent pour l'administration à des mammi-
fères à sang chaud dans des compositions pharmaceutiquement
acceptables, par exemple des compositions administrées par
voies sous-cutanée, intraveineuse, intramusculaire ou orale.
On prépare ces compositions en utilisant des excipients
10 courants bien connus de l'homme de l'art.

REVENDEICATIONS

1. Tétradécapeptide cyclique de formule :

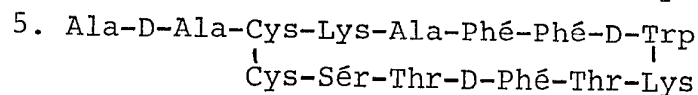
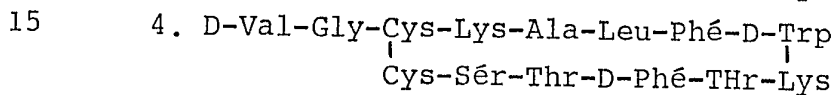
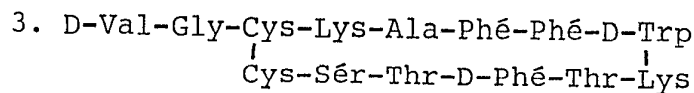
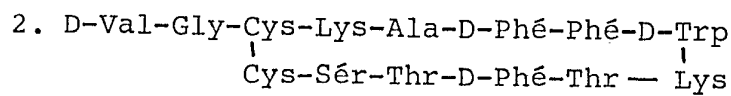


dans laquelle

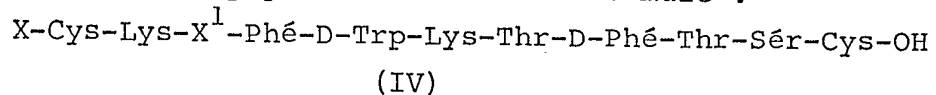
5 X est H-Ala-D-Ala, H-D-Ala-Gly ou H-D-Val-Gly ; et
X¹ est Ala-Leu, Ala-Phé, Ala-D-Phé, D-Ala-Phé ou
D-Ala-Cha ;

ou un de ses sels d'addition d'acide pharmaceutiquement
acceptables non toxiques.

10



6. Procédé de préparation d'un composé selon la
20 revendication 1, caractérisé en ce qu'il consiste à faire
réagir un tétradécapeptide linéaire de formule :



dans laquelle :

25 X et X¹ sont tels que défini précédemment, ou un de
ses sels d'addition d'acide pharmaceutiquement acceptables
non toxiques, avec un agent oxydant.

7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en
ce que l'agent oxydant est l'air.

30 8. Composition pharmaceutique caractérisée en ce
qu'elle comprend un tétradécapeptide cyclique de formule
(III) tel que défini dans l'une quelconque des revendications
1 à 5, et un support pharmaceutiquement acceptable.

9. Méthode d'inhibition de la sécrétion de l'hormone
35 de croissance chez un mammifère, caractérisée en ce qu'elle
consiste à administrer un tétradécapeptide cyclique de
formule (III) selon l'une quelconque des revendications 1 à
5.

