



(12) Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **236 536 A5**

4(51) C 07 K 7/20  
C 07 K 7/10

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

|      |                       |      |          |      |          |
|------|-----------------------|------|----------|------|----------|
| (21) | AP C 07 K / 276 457 3 | (22) | 17.05.85 | (44) | 11.06.86 |
| (31) | 611,844               | (32) | 18.05.84 | (33) | US       |

- (71) siehe (73)
- (72) Rivier, Jean, E. F.; Vale, Eylie, W., US
- (73) The Salk Institute for Biological Studies, California 92037, US

(54) **Verfahren zur Herstellung eines synthetischen Peptides**

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines synthetischen Peptides mit Einfluß auf die Sekretion der Hypophyse für die Anwendung zur Diagnostik oder zur Beschleunigung des Wachstums in der Tierproduktion. Ziel der Erfindung ist die Bereitstellung neuer Peptide mit höherer Aktivität, die gegenüber dem enzymatischen Abbau im Körper widerstandsfähig sind. Erfindungsgemäß werden neue Peptide mit der folgenden Sequenz hergestellt:  
 $R_1-R_2-R_3-Ala-Ile-Phe-Thr-R_8-Ser-R_{10}-Arg-R_{12}-R_{13}-R_{14}-R_{15}-Gln-R_{17}-R_{18}-Ala-Arg-Lys-Leu-R_{23}-R_{24}-R_{25}-Ile-R_{27}-R_{28}-R_{29}-Gln-Gln-Gly-Glu-R_{34}-Asn-Gln-Glu-R_{38}-R_{39}-R_{40}-Arg-R_{42}-R_{43}-R_{44}$   
 worin  $R_1$  Tyr, D-Tyr, Phe, D-Phe, pCl-Phe, Leu, His oder D-His darstellt mit entweder einer C<sup>α</sup>Me- oder N<sup>α</sup>-Me-Substitution oder in unsubstituierter Form;  $R_2$  ist Ala, D-Ala oder D-NMA;  $R_3$  ist Asp oder D-Asp;  $R_8$  ist Ser, Asn, D-Ser oder D-Asn;  $R_{10}$  ist Tyr oder D-Tyr;  $R_{12}$  ist Arg oder Lys;  $R_{13}$  ist Ile oder Val;  $R_{14}$  ist Leu oder D-Leu;  $R_{15}$  ist Gly oder D-Ala;  $R_{17}$  ist Leu oder D-Leu;  $R_{18}$  ist Tyr oder Ser;  $R_{23}$  ist Leu oder D-Leu;  $R_{24}$  ist His oder Gln;  $R_{25}$  ist Glu, Asp, D-Glu oder D-Asp;  $R_{27}$  ist Met, D-Met, Ala, Nle, Ile, Leu, Nva oder Val;  $R_{28}$  ist Asn oder Ser;  $R_{29}$  ist Arg oder D-Arg;  $R_{34}$  ist Arg oder Ser;  $R_{38}$  ist Gln oder Arg;  $R_{39}$  ist Arg oder Gly;  $R_{40}$  ist Ser oder Ala;  $R_{42}$  ist Phe, Ala oder Val;  $R_{43}$  ist Asn oder Arg;  $R_{44}$  ist mit der Maßgabe, daß irgendeiner oder alle der Reste zwischen  $R_{28}$  und einschließlich  $R_{44}$  gestrichen werden können und der weiteren Maßgabe, daß  $R_2$  D-NMA und/oder  $R_{14}$  D-Leu und/oder  $R_{29}$  D-Arg ist.

Verfahren zur Herstellung eines synthetischen Peptides

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Peptides mit Einfluß auf die Funktion der Hypophyse beim Menschen oder bei anderen Lebewesen. Insbesondere wird erfindungsgemäß ein Peptid hergestellt, daß die Freisetzung von Wachstumshormonen durch die Hypophyse beschleunigt.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Physiologen haben seit längerer Zeit erkannt, daß der Hypothalamus die sekretorischen Funktionen der Adenohypophyse mit den vom Hypothalamus produzierten speziellen Substanzen steuert, die die Sekretion jedes Hypophysenhormons stimuliert oder inhibiert. Ein hypothalamischer Inhibierungsfaktor wurde 1972 in Form von Somatostatin charakterisiert, das die Sekretion von Wachstumshormon (GH) inhibiert. Im Jahre 1982 wurden humanpankreatische (Tumor) freisetzende Faktoren (hpGRF) aus Extraktionen menschlicher pankreatischer Tumore isoliert, gereinigt, bestimmt, synthetisiert und getestet, wobei gefunden wurde, daß sie die Freisetzung von GH durch die Hypophyse beschleunigen. Beide hypophysiotrope Faktoren wurden durch Totalsynthese reproduziert, und es wurden Analoge der natürlichen Strukturen synthetisiert. Man vermutet, daß der humanhypothalamische GH-freisetzende Faktor präzise die gleiche Struktur hat; somit wird der Begriff hGRF hier anschließend verwendet. Außerdem wurde ein entsprechender schweinehypothalamischer GH-freisetzender Faktor (pGRF), ein entsprechender

rattenhypothalamischer GH-freisetzender Faktor (rGRF) und ein entsprechender rinderhypothalamischer GH-freisetzender Faktor bGRF charakterisiert und synthetisiert.

### Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist die Bereitstellung von neuen synthetischen Peptiden mit Einfluß auf die Funktion der Hypophyse, die gegenüber bekannten Peptiden eine wesentlich höhere Aktivität aufweisen und die gegenüber dem enzymatischen Abbau im Körper widerstandsfähig sind.

### Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, neue Peptide mit den gewünschten Eigenschaften und Verfahren zu ihrer Herstellung aufzufinden.

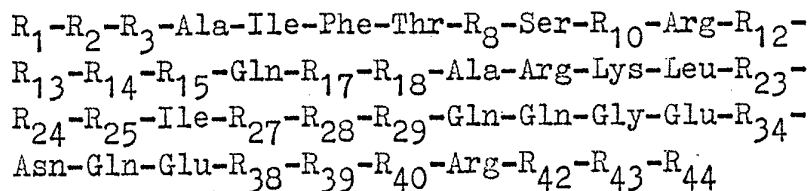
Es wurden nun synthetische Polypeptide synthetisiert und getestet, die GH aus kultivierten Hypophysenzellen freisetzen und die zumindest teilweise den enzymatischen Abbau im Körper hemmen und eine sehr wesentlich gesteigerte Potenz zeigen. Diese Peptide weisen  $N\alpha$ -CH<sub>3</sub>-D-Ala (D-NMA) in 2-Stellung und/oder D-Leu in 14-Stellung und/oder D-Arg in 29-Stellung auf und vorzugsweise auch Nle in 27-Stellung. D-Leu kann in 17- und/oder 23-Stellung vorhanden sein, und entweder D-Glu oder D-Asp kann in der 25-Stellung vorhanden sein. Die Peptide können auch einen der folgenden Reste in der 1-Stellung haben: Tyr, D-Tyr, Met, Phe, D-Phe, pCL-Phe, Leu, His und D-His, wobei diese Reste gegebenenfalls eine Methylsubstitution entweder am alpha-Kohlenstoff oder in der alpha-Aminogruppe aufweisen können. Sie können gegebenenfalls D-Asp in 3-Stel-

lung und/oder entweder D-Arg oder D-Ser in 8-Stellung und/oder D-Tyr in 10-Stellung und/oder D-Ala in 15-Stellung aufweisen. Auch können sie D-Met oder Nva anstelle von entweder Nle oder Met in 27-Stellung aufweisen.

Zu pharmazeutischen Zusammensetzungen in Zusammenhang mit der Erfindung gehören derartige Analoge mit zwischen etwa 27 und 44 Resten in der Länge, oder eines ihrer nichttoxischen Salze, dispergiert in einer pharmazeutisch oder veterinär annehmbaren Flüssigkeit oder einem festen Träger. Derartige pharmazeutische Zusammensetzungen können in der klinischen Human- oder Veterinärmedizin zur Verabreichung für therapeutische Zwecke auch zu diagnostischen Zwecken eingesetzt werden. Darüber hinaus können sie dazu verwendet werden, das Wachstum von Warmblütern einschließlich Vögeln (Geflügel) sowie in der Aquikultur bei Kaltblütern, z. B. Fischen, Aalen usw. zu beschleunigen.

Die zur Definition der Peptide verwendeten Nomenklatur entspricht der von Schroder u. Lubke in "Die Peptide" (The Peptides), Academic Press, 1965, worin in Übereinstimmung mit der üblichen Darstellung die Aminogruppe am N-Ende (N-Terminal) links und die Carboxygruppe am C-Ende (C-Terminal) rechts erscheint. Unter natürlichen Aminosäuren sind übliche, natürlich auftretende, in Proteinen zu findende Aminosäuren zu verstehen, wie Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, Thr, Lys, Arg, Asp, Asn, Glu, Gln, Cys, Met, Phe, Tyr, Pro, Trp und His. Mit Nle ist Norleucin und mit Nva ist Norvalin gemeint. Wo die Aminosäurereste isomere Formen aufweisen, ist es die L-Form, die dargestellt ist, falls nichts anderes ausdrücklich hervorgehoben wird. D-NMA bedeutet das D-Isomere von Alanin, worin die alpha-Aminogruppe durch Methyl substituiert ist.

Die Erfindung betrifft synthetische Peptide mit der folgenden Sequenz (I):



worin  $R_1$  Tyr, D-Tyr, Met, Phe, D-Phe, pCl-Phe,

Leu, His oder D-His bedeutet mit entweder einer C<sup>α</sup>Me oder N<sup>α</sup>Me-Substitution oder unsubstituiert ist,  $R_2$  ist Ala, D-Ala oder D-NMA;  $R_3$  ist Asp oder D-Asp;  $R_8$  ist Ser, Asn, D-Ser oder D-Asn;  $R_{10}$  ist Tyr oder D-Tyr;  $R_{12}$  ist Arg oder Lys;  $R_{13}$  ist Ile oder Val;  $R_{14}$  ist Leu oder D-Leu;  $R_{15}$  ist Gly oder D-Ala;  $R_{17}$  ist Leu oder D-Leu;  $R_{18}$  ist Tyr oder Ser;  $R_{23}$  ist Leu oder D-Leu;  $R_{24}$  ist His oder Gln;  $R_{25}$  ist Glu, Asp, D-Glu oder D-Asp;  $R_{27}$  ist Met, D-Met, Ala, Nle, Ile, Leu, Nva oder Val;  $R_{28}$  ist Asn oder Ser;  $R_{29}$  ist Arg oder D-Arg;  $R_{34}$  ist Arg oder Ser;  $R_{38}$  ist Gln oder Arg;  $R_{39}$  ist Arg oder Gly;  $R_{40}$  ist Ser oder Ala;  $R_{42}$  ist Phe, Ala oder Val;  $R_{43}$  ist Asn oder Arg;  $R_{44}$  ist eine natürliche Aminosäure;

mit der Maßgabe, daß beliebige oder alle Reste zwischen  $R_{28}$  und einschließlich  $R_{44}$  gestrichen werden können und der weiteren Maßgabe, daß  $R_2$  D-NMA und/oder  $R_{14}$  D-Leu und/oder  $R_{29}$  D-Arg ist. "Y" wird hier für die Darstellung des Carboxyteiles des Aminosäurerestes am C-Terminal verwendet und einer der folgenden Radikale sein: -COOR, -CRO, -CONHNHR, -CON(R) (R') oder -CH<sub>2</sub>OR, wobei R und R' Niederalkyl, Fluorniederalkyl oder Wasserstoff sein können und die bevorzugten Niederalkylgruppen Methyl, Ethyl und Propyl sind.

Wenn sich ein Rest in der 44-Stellung befindet, wird üblicher-

weise eine Aminosäure außer Cys gewählt, falls der Wunsch besteht, ein Dimeres zu bilden oder das synthetische Peptid an ein anderes Peptid zu koppeln. Wenn Met in 1-Stellung auftritt, ist es vorzuziehen, einen anderen Rest in 27-Stellung zu haben.

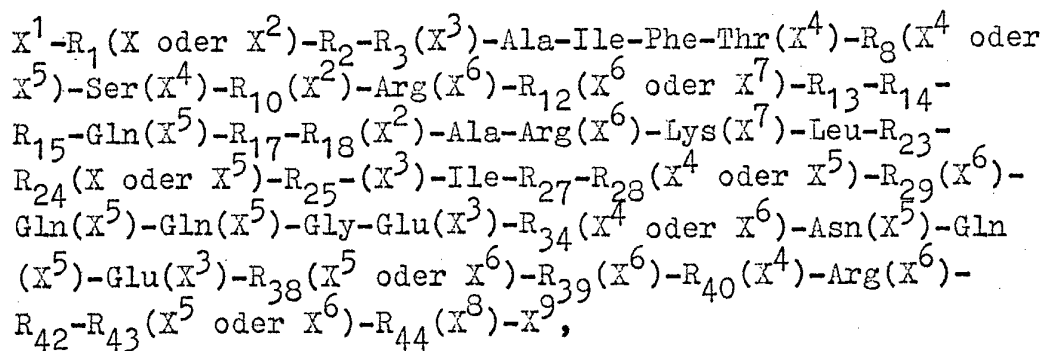
Wie oben aufgeführt, haben Fragmente, die sich von N-Terminal her über den Rest-27 erstrecken, biologische Wirksamkeit bei der Freisetzung von GH durch die Hypophyse und derartige biologisch aktive Fragmente werden als in den Schutzzumfang der Erfindung fallend betrachtet. Wenn sich das Peptidfragment nur bis zum Rest 27 oder 28 erstreckt, sollte Y-CONH<sub>2</sub> oder ein substituiertes Amid sein. Wenn sich das Fragment bis auf einen der Reste 29 bis 39 erstreckt, ist vorzugsweise ein Amid oder ein substituiertes Amid, kann aber auch -COOH sein. Wenn das Fragment 40 oder mehr Reste hat, gibt es keine deutliche Präferenz für den Teil am C-Terminal.

Die Peptide wurden mittels geeigneter Verfahren synthetisiert, beispielsweise durch alleinige Festphasentechnik, teilweise Festphasentechnik, Fragmentkondensation oder klassische Lösungskupplungen. Es kann auch die kürzlich entwickelte rekombinante DNA-Technik eingesetzt werden, um einen Teil eines Analogens, der nur natürliche Aminosäurereste enthält, herzustellen, der dann mit einem kurzen N-Terminal-Peptid verbunden wird. Beispielsweise sind die Techniken der vollständigen Festphasensynthese in dem Lehrbuch "Solid-Phase Peptide Synthesis" (Festphasenpeptidsynthese) von Stewart und Young, Freeman & Co., San Francisco, 1969 beschrieben und erläutert durch die Offenbarung in der US-PS 4 105 603 (Vale et al.), die am 8. August 1978 veröffentlicht wurde. Die klassische Lösungssynthese ist detailliert in der Monografie "Methoden der Organischen Chemie" von Houben-Weyl, Synthese von Peptiden, E. Wunsch (Herausgeber), Georg Thieme, Verlag Stuttgart, BRD, beschrieben

(Die Fragmentkondensationsmethode der Synthese ist in der US-PS 3 972 859 (vom 3. 8. 1976) erläutert. Andere gängige Synthesen sind in den US-PS 3 842 067 (vom 15. 10. 1974) und 3 862 925 (vom 28. 1. 1975) erläutert.

Allen diesen Synthesen gemeinsam ist der Schutz der labilen Seitenkettengruppen der verschiedenen Aminosäureteile mit geeigneten Schutzgruppen, die das Auftreten einer chemischen Reaktion an dieser Stelle verhüten, bis die Gruppe letztendlich entfernt wird. Üblicherweise ist ihnen weiterhin gemeinsam, der Schutz einer alpha-Aminogruppe an einer Aminosäure oder einem Fragment, während dieses mit der Carboxygruppe reagiert, gefolgt von der selektiven Entfernung der alpha-Aminoschutzgruppe, um nun die Reaktion an dieser Stelle stattfinden zu lassen. Demgemäß ist es gewöhnlich so, daß als eine Stufe der Synthese eine Zwischenverbindung hergestellt wird, zu der jeder der Aminosäurereste gehört, angeordnet in der gewünschten Sequenz in der Peptidkette mit Seitenkettenschutzgruppen, die mit den entsprechenden Resten verbunden sind.

Als innerhalb des Schutzzumfanges der vorliegenden Erfindung befindlich werden auch Zwischenprodukte der Formel (II) angesehen:



worin  $X^1$  entweder Wasserstoff oder eine  $\alpha$ -Aminoschutzgruppe

sind solche, die aus dem Stand der Technik für die stufenweise Synthese von Polypeptiden bekannt sind. Unter die zu verwendenden Klassen von  $\alpha$ -Aminoschutzgruppen, die als  $X^1$  eingesetzt werden können, fallen (1) aromatische Schutzgruppen vom Urethantyp wie Fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc), Benzylloxycarbonyl (Z) und substituiertes Z, wie p-Chlorbenzyloxycarbonyl, p-Nitrobenzyloxycarbonyl, p-Brombenzyloxycarbonyl und p-Methoxybenzyloxycarbonyl; (2) aliphatische Urethan-Schutzgruppen wie t-Butyloxycarbonyl (BOC), Diisopropylmethyloxycarbonyl, Isopropylloxycarbonyl, Ethoxycarbonyl, Allyloxycarbonyl, und (3) Cycloalkyl-Urethantyp-Schutzgruppen wie Cyclopentylloxycarbonyl, Adamantylloxycarbonyl und Cyclohexylloxycarbonyl. Die bevorzugte  $\alpha$ -Aminoschutzgruppe ist BOC, gerade dann, wenn ein  $N^{\alpha}$ -Me-substituierter Rest sich in 1-Stellung befindet.

X ist Wasserstoff oder eine Schutzgruppe für den Imidazolstickstoff von His, wie z.B. Tos.

$X^2$  kann eine geeignete Schutzgruppe für die phenolische Hydroxylgruppe von Tyr sein, wie Tetrahydropyranyl, tert.-Butyl, Trityl, Bzl, CBZ, 4Br-CBZ und 2,6-Dichlorbenzyl (DCB). Die bevorzugte Schutzgruppe ist 2,6-Dichlorbenzyl.  $X^2$  kann Wasserstoff sein, das bedeutet, daß es in dieser Stellung keine Seitenkettenschutzgruppe am Aminosäurerest gibt.

$X^3$  ist Wasserstoff oder eine geeignete esterbildende Schutzgruppe für die Carboxygruppe von Asp oder Glu, wie Benzyl (OBzl), 2,6-Dichlorbenzyl, Methyl und Ethyl.

$X^4$  kann eine geeignete Schutzgruppe für die Hydroxygruppe von Thr oder Ser sein, wie Acetyl, Benzoyl, tert.-Butyl, Trityl, Tetrahydropyranyl, Bzl, 2,6-Dichlorbenzyl und CBZ. Die bevorzugte Schutzgruppe ist Bzl.  $X^4$  kann Wasserstoff sein, was be-



deutet, daß keine Schutzgruppe an der Hydroxygruppe vorhanden ist.

X<sup>5</sup> ist Wasserstoff oder eine geeignete Schutzgruppe für die Seitenkettenaminogruppe von Asn oder Gln. Es ist vorzugsweise Xanthyl (Xan).

X<sup>6</sup> ist eine geeignete Schutzgruppe für die Guanidingruppe von Arg, wie Nitro, Tos, CBZ, Adamantylloxycarbonyl und BOC, oder ist Wasserstoff.

X<sup>7</sup> ist Wasserstoff oder eine geeignete Schutzgruppe für die Seitenkettenaminogruppe von Lys, Beispiele für geeignete Seitenkettenamino-Schutzgruppen sind 2-Chlorbenzyloxycarbonyl (2-Cl-Z), Tos, t-Amyloxycarbonyl und BOC.

X<sup>8</sup> ist Wasserstoff oder eine geeignete Seitenkettenschutzgruppe wie sie generell weiter oben genannt wurde. Met kann gegebenenfalls durch Sauerstoff geschützt werden, wird aber vorzugsweise ungeschützt gelassen.

Die Auswahl einer Seitenkettenamino-Schutzgruppe ist nicht kritisch mit der Ausnahme, daß im allgemeinen eine auszuwählen ist, die während der Abspaltung der Schutzgruppen für die  $\alpha$ -Aminogruppen während der Synthese nicht entfernt wird. Allerdings ist für einige Aminosäuren, z.B. His, ein Schutz nicht allgemein erforderlich, nachdem die Kupplung vollzogen ist, und die Schutzgruppen können dieselben sein.

X<sup>9</sup> ist eine geeignete Schutzgruppe für die Carboxygruppe am C-Ende, wie die esterbildende Gruppe X<sup>3</sup>, oder sie ist eine Haftbindung, wie sie bei der Festphasensynthese zur Bindung an einen festen Harzträger benutzt wird, oder sie ist das -X<sup>9</sup>, wobei in diesem Falle der Rest am C-Ende einen Carboxyteil

hat, der Y ist, wie es weiter vorher definiert worden ist. Wenn ein solcher fester Harzträger verwendet wird, ist er im weitesten Sinne als Schutzgruppe anzusehen und kann irgendeiner von denen aus dem Stand der Technik sein, wie:  $-O-CH_2-$  Harzträger,  $-NH-$  Benzylhydrilamin-(BHA)-Harzträger oder  $-NH-$  Paramethylbenzylhydrilamin-(MBHA)-Harzträger. Wenn das unsubstituierte Amid gewünscht ist, ist das BHA- oder MBHA-Harz bevorzugt, da die Abspaltung direkt zum Amid führt. Für den Fall, daß das N-Methylamid gewünscht wird, kann es aus dem N-Methyl-BHA-Harz erzeugt werden. Sollten andere substituierte Amide gewünscht sein, oder sollten andere Gruppen als die freie Säure am C-Ende gewünscht sein, kann es vorzuziehen sein, das Peptid unter Verwendung klassischer Methoden gemäß Houben-Weyl zu synthetisieren.

In der Formel für das Zwischenprodukt ist zumindest eine der X-Gruppen eine Schutzgruppe, oder  $X^9$  erfaßt einen Harzträger.

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung eines gewünschten Peptids durch

- a) Bilden eines Peptids mit wenigstens einer Schutzgruppe und der Formel (II), worin  $X$ ,  $X^1$ ,  $X^2$ ,  $X^3$ ,  $X^4$ ,  $X^5$ ,  $X^6$ ,  $X^7$  und  $X^8$  jeweils entweder Wasserstoff oder eine Schutzgruppe darstellt und  $X^9$  ist entweder eine Schutzgruppe oder eine Haftbindung an dem Harzträger oder des  $-X^9$ , in welchem Falle der Rest am C-Ende einen Carboxyteil ist, der Y entspricht;
- b) Abspalten der Schutzgruppe oder -gruppen oder der Haftbindung von dem Peptid der Formel (II) und
- c) gewünschtenfalls Umwandeln des erhaltenen Peptids in dessen nichttoxisches Salz.

Bei der Auswahl einer besonderen Seitenkettenschutzgruppe, die

bei der Synthese der Peptide eingesetzt wird, bestehen folgende allgemeine Regeln: (a) die Schutzgruppe behält vorzugsweise ihre Schutzeigenschaften und wird nicht unter Kupplungsbedingungen abgespalten, (b) die Schutzgruppe sollte dem Reagenz gegenüber stabil sein und ist, mit Ausnahme von Xyn, vorzugsweise unter den Reaktionsbedingungen stabil, die für die Entfernung der  $\alpha$ -Aminoschutzgruppe bei jeder Synthesestufe ausgewählt wird, und (c) die Seitenkettenschutzgruppe muß nach Ende der Synthes entfernenbar sein, bei der man die gewünschte Aminosäuresequenz erhält, und zwar unter Reaktionsbedingungen, die die Peptidkette nicht in unerwünschter Weise beeinträchtigen.

Wenn die Peptide nicht nach der rekombinanten DNS-Technologie hergestellt werden, werden sie vorzugsweise mittels Festphasensynthese hergestellt, die dies allgemein von Merrifield J. Am. Chem. Soc. 85 (1963) p 2149 beschrieben wurde, obgleich auch nach anderen aus dem Stand der Technik bekannten und oben genannten Verfahren gearbeitet werden kann. Bei der Festphasensynthese wird vom C-Ende des Peptids begonnen, indem eine geschützte  $\alpha$ -Aminosäure an ein geeignetes Harz gekuppelt wird. Ein solches Startmaterial kann durch Anfügen einer  $\alpha$ -Aminogeschützten Aminosäure über eine Esterbindung an ein chlor-methyliertes Harz oder ein Hydroxymethylharz oder durch eine Amidbindung an ein BHA-Harz oder MBHA-Harz hergestellt werden. Die Herstellung des Hydroxymethylharzes ist von Bodansky et al., Chem. Ind. (London) 38 (1966) 1597-98 beschrieben worden. Chlormethyliertes Harze sind kommerziell von Bio Rad Laboratories, Richmond, Californien und von Lab. Systems, Inc. erhältlich. Die Herstellung eines solchen Harzes ist von Stewart et al., "Solid Phase Peptide Syntheses" (Freeman & Co., San Francisco, 1969) Kap. 1, S. 1-6 beschrieben worden. BHA- und MBHA-Harzträger sind kommerziell erhältlich und werden um allgemeinen eingesetzt, wenn die zu synthetisierenden gewünsch-

ten Polypeptide ein unsubstituiertes Amid am C-Ende haben.

Die Aminosäure mit C-Ende, z.B. Asn, geschützt durch BOC und durch Xan, kann zuerst an das chlormethylierte Harz gekuppelt werden, und zwar nach der Verfahrensweise, die in Chemistry Letters (1978), 165-168 von K. Horiki et al. beschrieben wurde, unter Verwendung von KF in DMF bei etwa 60° C über 24 Stunden und unter Rühren, wenn das Peptid mit 43 Resten zu synthetisieren ist. Nach dem Kuppeln der BOC-geschützten Aminosäure an den Harzträger wird die  $\alpha$ -Aminoschutzgruppe entfernt unter Verwendung von Trifluoressigsäure (TFA) in Methylenchlorid oder in TFA allein. Das Abspalten der Schutzgruppe wird bei einer Temperatur von zwischen etwa 0° C und Zimmertemperatur durchgeführt. Andere Standardpräparate zum Abspalten, wie HCl in Dioxan sowie Bedingungen zur Entfernung der spezifischen  $\alpha$ -Aminoschutzgruppen können gemäß der Beschreibung in Schroder u. Lubke "The Peptides"; 1, S. 72-75 (Academic Press 1965) eingesetzt werden.

Nach Entfernung der  $\alpha$ -Aminoschutzgruppe werden die verbliebenen  $\alpha$ -Amino- und Seitenketten-geschützten Aminosäuren schrittweise in gewünschtem Maße gekuppelt, wobei man ein bereits oben definiertes Zwischenprodukt erhält, oder als Alternative zur Zugabe jeder Aminosäure separat in der Synthese, die mögliche Kupplung einiger von ihnen aneinander bereits vor der Zugabe zum Festphasen-Reaktionsgefäß. Die Auswahl eines entsprechenden Kupplungsreagenz erfolgt gemäß dem Stand der Technik. Insbesondere als Kupplungsreagenz geeignet ist N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCCI).

Die bei der Festphasensynthese der Peptide eingesetzten aktivierenden Reagentien sind in der Peptidchemie bekannt. Beispiele geeigneter aktivierender Reagentien sind Carbodiimide wie N,N'-Diisopropylcarbodiimid und N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)

carbodiimid. Andere aktivierende Reagentien und deren Verwendung bei der Peptidkupplung sind von Schroder und Lubke s.o. im Kap. III und von Kappór in J. Pharm. Sci. 59 (1970) S. 1-27 beschrieben worden.

Jede geschützte Aminosäure oder Aminosäuresequenz wird in das Festphasen-Reaktionsgefäß in etwa dem vierfachen Überschuß oder mehr eingebracht, und die Kupplung kann in einem Medium von Dimethylformamid (DMF):CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1) oder in DMF oder CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> allein durchgeführt werden. In Fällen, wo die Kupplung unvollständig ist, wird die Kupplungsprozedur wiederholt bevor die Entfernung der  $\alpha$ -Aminoschutzgruppe vor dem Kuppeln der nächsten Aminosäure erfolgt. Der Erfolg der Kupplungsreaktion in jedem Synthesestadium, wenn sie manuell durchgeführt wird, wird vorzugsweise über die Ninhydrinreaktion verfolgt, wie von E. Kaiser et al. in Anal. Biochem. 34 (1970) 595 beschrieben. Die Kupplungsreaktionen können automatisch durchgeführt werden wie z.B. auf einem Beckmann 990-Automatiksynthesizer unter Verwendung eines Programms wie von Rivier et al. in Biopolymers, 1979, 17, S. 1927-1938 berichtet.

Nachdem die gewünschte Aminosäuresequenz vollständig ist, kann das Zwischenprodukt-Peptid vom Harzträger entfernt werden durch Behandlung mit einem Reagenz wie Flußsäure, das nicht nur das Peptid vom Träger abspaltet, sondern ebenso die verbliebenen Seitenkettenschutzgruppen X, X<sup>2</sup>, X<sup>3</sup>, X<sup>4</sup>, X<sup>5</sup>, X<sup>6</sup>, X<sup>7</sup> und X<sup>8</sup> und die Haftbindung X<sup>9</sup> und ebenso die  $\alpha$ -Aminoschutzgruppe X<sup>1</sup>, wenn eine vorhanden ist, um das Peptid als freie Säure zu erhalten. Wenn in der Sequenz Met vorhanden ist, wird die BOC-Schutzgruppe vorzugsweise zuerst entfernt unter Verwendung von Trifluoressigsäure (TFA)/Ethandithiol vor dem Abtrennen des Peptids vom Harz mit HF, um die potentielle S-Alkylierung zu eliminieren. Wenn zum Abtrennen Flußsäure eingesetzt wird, werden Anisol und

Methylethylsulfid als Spülmittel in den Reaktionsbehälter eingebracht.

### Ausführungsbeispiel

Die Erfindung wird nachstehend an einigen Beispielen näher erläutert.

Das folgende Beispiel stellt ein bevorzugtes Verfahren zur Synthetisierung von Peptiden mittels Festphasentechnik dar. Es ist natürlich selbstverständlich, daß die Synthese eines entsprechend kürzeren Peptidfragments in der gleichen Weise bewirkt wird durch einfaches Eliminieren der notwendigen Anzahl von Aminosäuren an jedem Ende der Kette; allerdings wird gegenwärtig vermutet, daß biologisch aktive Fragmente die angezeigte Sequenz am N-Ende enthalten sollten.

### Beispiel I

Die Synthese des Peptids (N<sup>ω</sup>-MeTyr<sup>1</sup>, D-NMA<sup>2</sup>, D-Leu<sup>23</sup>)-rGRF (1-43)-OH mit der Formel

N MeTyr-D-NMA-Asp-Aöa-Ile-Phe-Thr-Ser-Ser-Tyr-Arg-Arg-Ile-Leu-Gly-Gln-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-D-Leu-His-Glu-Ili-Met-Asn-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-Arg-Ser-Arg-Phe-Asn-OH

wurde schrittweise durchgeführt unter Verwendung eines Beckmann 990-Peptid-Synthetisators auf einem chlormethylierten Harz mit einem Substitutionsbereich von etwa 0,1 bis 0,5 mmol/g Harz. Die Kupplung von BOC-Asn(Xan) an das Harz erfolgte gemäß der allgemeinen Verfahrensweise in Chemical Letters, siehe

oben, unter Verwendung von KP in DMF bei etwa 60° C über 24 Stunden unter Rühren, wobei man eine Substitution von etwa 0,35 mmol Asn pro Gramm Harz erhielt.

Nach dem Entblockieren und der Neutralisation wurde die Peptidkette schrittweise am Harz aufgebaut in allgemeiner Übereinstimmung nach der Verfahrensweise von Rivier, J.; J. Amer. Chem. Soc. 96, 2986-2992 (1974). Alle dabei verwendeten Lösungsmittel waren sorgfältig durch Spülen mit einem Inertgas wie z.B. Helium oder Stickstoff entgast worden, um zu sichern, daß kein Sauerstoff vorhanden war, wodurch der Schwefel des Met-Restes in unerwünschter Weise oxidiert werden könnte.

Das Entblockieren erfolgt vorteilhaft in Übereinstimmung mit der folgenden Tabelle A.

Tabelle A

| <u>Reagenz</u>   | <u>Mischzeit (Minuten)</u> |
|--|----------------------------|
| 1. 60 % TFA/2 % Ethandithiol                                   | 10                         |
| 2. 60 % TFA/2 % Ethandithiol                                   | 15                         |
| 3. IPA/1 % Ethandithiol  | 0,5                        |
| 4. Et <sub>3</sub> N (10 %) in CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> | 0,5                        |
| 5. MeOH  | 0,5                        |
| 6. Et <sub>3</sub> N (10 %) in CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> | 0,5                        |
| 7. MeOH (zweimal)  | 0,5                        |
| 8. CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (zweimal)                   | 0,5                        |

Die Kupplungen wurden vorzugsweise gemäß der folgenden Tabelle B durchgeführt:

Tabelle B

| <u>Reagenz</u>  | <u>Mischzeit (Minuten)</u> |
|---|----------------------------|
| 9. DCCI   | -                          |
| 10. Boc-Aminosäure  | 50 - 90                    |
| 11. Me OH (zweimal)   | 0,5                        |
| 12. CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (zweimal)                   | 0,5                        |
| 13. Ac <sub>2</sub> O (3M) in CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ) | 15,0                       |
| 14. CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>                             | 0,5                        |
| 15. MeOH  | 0,5                        |
| 16. CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (zweimal)                   | 0,5                        |

Es wurden ein- bis zwei mmol BOC-geschützter Aminosäure in Methylenchlorid pro g Harz eingesetzt plus ein Äquivalent 1,0 molarem DCCI in Methylenchlorid für zwei Stunden. Wenn BOC-Arg (TOS) gekuppelt wird, wird ein Gemisch von 50 % DMF und Methylenchlorid verwendet. Bzl-Ether wurde Hydroxy-Seitenketten-schutzgruppe für Ser und Thr eingesetzt. Die Amidogruppe von Asn oder Gln wurde durch Xan geschützt wenn die DCC-Kupplung verwendet wird, wie es bevorzugt wird. Es kann auch p-Nitrophenylester (ONp) verwendet werden, um das Carboxyende von Asn oder Gln und beispielsweise BOC-Asn (ONp) kann über Nacht unter Einsatz von einem Äquivalent HOBT in einem 50 %igen Gemisch von DMF und Methylenchlorid gekuppelt werden. Als Schutzgruppe für die Lys-Seitenkette wurde 2-Chlor-benzyloxycarbonyl (2Cl-Z) verwendet. Tos wurde eingesetzt, um die Guanidingruppen von Arg und den Imidazolstickstoff von His zu schützen, und die Glu- oder Asp-Seitenketten-Carboxygruppe wurde mit OBzl geschützt. Die phenolische Hydroxygruppe von Tyr wurde mit 2,6-Dichlorbenzyl (DCB) geschützt. Am Ende der Synthese erhielt man die folgende Zusammensetzung:

BOC-N<sup>1</sup> MeTyr(X<sup>2</sup>)-D-NMA-Asp(X<sup>3</sup>)-Ala-Ile-Phe-Thr(X<sup>4</sup>)-Ser(X<sup>4</sup>)-Ser(X<sup>4</sup>)-Tyr(X<sup>2</sup>)-Arg(X<sup>6</sup>)-Arg(X<sup>6</sup>)-Ile-Leu-Gly-Gln(X<sup>5</sup>)-Leu-Tyr(X<sup>2</sup>)-Ala-Arg(X<sup>6</sup>)-Lys(X<sup>7</sup>)-Leu-D-Leu-His(X)-Glu(X<sup>3</sup>)-Ile-Met-Asn(X<sup>5</sup>)-Arg(X<sup>6</sup>)-Gln(X<sup>5</sup>)-Gln(X<sup>5</sup>)-Gly-Glu(X<sup>3</sup>)-



Arg(X<sup>6</sup>)-Asn(X<sup>5</sup>)-Gln(X<sup>5</sup>)-Glu(X<sup>3</sup>)-Gln(X<sup>5</sup>)-Arg(X<sup>6</sup>)-  
Ser(X<sup>4</sup>)-Arg(X<sup>6</sup>)-Phe-Asn(X<sup>5</sup>)-X<sup>9</sup> worin X<sup>2</sup> DCB ist, X<sup>3</sup> ist OBzl,  
X<sup>4</sup> ist Bzl, X<sup>5</sup> ist Xan, X<sup>6</sup> ist Tos, X<sup>7</sup> ist 2Cl-Z und X<sup>9</sup> ist  
-O-CH<sub>2</sub>-Harztäger.

Xan kann teilweise oder vollständig durch TFA-Behandlung entfernt werden, um die  $\alpha$ -Aminoschutzgruppe zu entblockieren.

Um das geschützte Peptidharz zu spalten und zu entschützen, wurde es mit 1,5 ml Anisol, 0,5 ml Methylmethyilsulfid und 15 ml Flußsäure (HF) pro Gramm Peptidharz bei -20° C für eine halbe Stunde und bei 0° C für eine halbe Stunde behandelt. Nach der Entfernung von HF unter Hochvakuum wurde der Harz abwechselnd mit trockenem Diethylether und Chloroform gewaschen und das Peptid dann mit 2 N wäßriger Essigsäure extrahiert und aus dem Harz durch Filtrieren abgetrennt. Das gespaltene und entschützte Peptid wurde dann in 0 bis 5 %iger Essigsäure gelöst und gereinigt beispielsweise mittels Sephadex G-50 Feingelfiltration.

Das Peptid wurde dann weiter durch präparative oder halbpräparative HPLC gereinigt, wie bei Rivier et al., Peptides: Struktur und biologische Funktion (Peptides: Structure and Biological Function) (1979) S. 125-128 und Marki et al. J. Arn. Chem. Soc. 103, 3178 (1981) beschrieben. Patronen von Waters Associates prep LC-500 wurden mit 15-20  $\mu$  C<sub>18</sub> Silicia von Vydac (300 A) gepackt. Ein Gradient von CH<sub>3</sub>CN in TEAP wurde durch einen Niederdruck-Eldexgradientenerzeuger erzeugt wie bei Rivier J.; J. Liq. Chromatography 1, 343-367 (1978) beschrieben. Die chromatografischen Fraktionen wurden sorgfältig über HPLC beobachtet und nur die Fraktionen, die wesentliche Reinheit zeigten, wurden vereinigt. Die Entsalzung der gereinigten Fraktionen, die unabhängig auf Reinheit geprüft wurden, erreichte man unter Verwendung eines Gradienten von CH<sub>3</sub>CN in 0,1 % TFA. Der Mittelschnitt wurde dann lyophilisiert, um das gewünschte Pep-

tid zu erhalten, wobei dessen Reinheit größer als 98 % sein kann.

Die Synthese wurde wiederholt unter Verwendung eines MBHA-Harzes, um das gleiche Peptid mit einem amidierten C-Terminus zu erhalten, unter Einsatz des ursprünglichen Verfahrens, wie es von Vale et al in der US-PS 4 292 313 beschrieben wurde, um Asn an das MBHA-Harz zu binden.

### Beispiel II

Die Synthese eines amidierten Peptids mit 40 Resten  $\left[ \overset{d}{C} \text{ MeHis}^1, \text{D-NMA}^2, \text{D-Leu}^{23} \right] - \text{hGRF (1-40)-NH}_2$  mit der Formel:

$\text{H-C}^d \text{ MeHis-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Asn-Arg-Lys-Leu-D-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-Ser-Arg-Gln-Gly-Glu-Ser-Asn-Gln-Glu-Arg-Gly-Ala-NH}_2$

wurde schrittweise durchgeführt unter Verwendung eines Beckmann 990-Peptid-Synthetisators auf einem MBHA-Harz wie allgemein von Vale et al. im US-Patent 4 292 313 beschrieben. Das Peptid wurde als im wesentlichen rein nach TLC und HPLC gefunden.

### Beispiel III

Die Synthese von  $\left[ \text{D-NMA}^2, \text{Nle}^{27} \right] - \text{rGRF (1-43)-OH}$  mit der Formel

$\text{H-His-D-DNMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Ser-Ser-Tyr-Arg-Arg-Ile-Leu-Gly-Gln-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-His-Glu-Ile-Nle-Asn-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-Arg-Ser-Arg-Phe-Asn-OH}$

wurde schrittweise durchgeführt unter Verwendung eines Beck-

mann 990-Peptid-Synthetisators auf einem chlormethylierten Harz, wie es allgemein im Beispiel 1 beschrieben wurde. Das Peptid wurde als im wesentlichen rein nach TLC und HPLC gefunden.

#### Beispiel IV

Die Synthese des hGRF-Analogfragments  $[D-NMA^2, Nle^{27}]$ -hGRF (1-32)-NH<sub>2</sub> mit der Formel

H-Tyr-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Ser-Arg-Gln-Gln-Gly-NH<sub>2</sub>

wurde schrittweise durchgeführt unter Verwendung eines Beckmann 990-Peptid-Synthetisators auf einem MBHA-Harz wie im Beispiel II beschrieben. Das Analoge wurde als im wesentlichen rein nach ZLC und HPLC gefunden. Die Synthese wurde zweimal wiederholt, und man erhielt  $[D-NMA^2, D-Met^{27}]$ -hGRF (1-32)-NH<sub>2</sub> und  $[D-NMA^2, D-Leu^{23}, Nle^{27}]$ -hGRF(1-32)-NH<sub>2</sub>.

#### Beispiel V

Die Synthese des hGRF-Analog-Fragments  $[D-NMA^2, Nle^{27}]$ -hGRF (1-29)-NH<sub>2</sub> mit der Formel

H-Tyr-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Ser-Arg-NH<sub>2</sub>

wurde schrittweise durchgeführt unter Verwendung eines Beckmann 990-Peptid-Synthetisators auf einem MBHA-Harz wie im Bei-

spiel II beschrieben.

Das Peptid wurde als im wesentlichen rein nach TLC und HPLC gefunden. Die Synthese wurde wiederholt und man erhielt  $\lceil$ D-NMA<sup>2</sup>, Nle<sup>27</sup> $\rceil$ -hGRF(1-27)-NH<sub>2</sub>

#### Beispiel VI

Die Synthese von  $\lceil$ D-NMA<sup>2</sup>, Nle<sup>27</sup> $\rceil$ -rGRF (1-29)-NH<sub>2</sub> mit der Formel

H-His-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Ser-Ser-Tyr-Arg-Arg-Ile-Leu-Gly-Gln-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-His-Glu-Ile-Nle-Asn-Arg-NH<sub>2</sub>

wurde schrittweise durchgeführt unter Verwendung eines Beckmann 990-Peptid-Synthetisators auf einem MBHA-Harz wie im Beispiel II beschrieben.

Das Peptid wurde als im wesentlichen rein nach TLC und HPLC gefunden. Die Synthese wurde wiederholt, um  $\lceil$ D-NMA<sup>2</sup>, D-Leu<sup>23</sup>, Nle<sup>27</sup> $\rceil$ -RGRF (1-29)-NH<sub>2</sub> zu erhalten.

#### Beispiel VII

Die Synthese von  $\lceil$ D-NMA<sup>2</sup>, D-Glu<sup>25</sup>, Nle<sup>27</sup> $\rceil$ -hGRF(1-29)-NH<sub>2</sub> mit der Formel

H-Tyr-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Als-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-D-Glu-Ile-Nle-Ser-Arg-NH<sub>2</sub>

wurde schrittweise durchgeführt unter Verwendung eines Beckmann 990-Peptid-Synthetisators auf einem MBHA-Harz wie im Beispiel II beschrieben. Das Peptid wurde als im wesentlichen rein

nach TLC und HPLC gefunden.

Beispiel VIII

Die Synthese von  $[D-NMA^2, D-Glu^{25}, Nva^{27}]$ -rGRF(1-29)-NH<sub>2</sub> mit der Formel

H-His-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Ser-Ser-Tyr-Arg-Arg-Ile-Leu-Gly-Gln-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-His-D-Glu-Ile-Nva-Asn-Arg-NH<sub>2</sub>

wurde schrittweise durchgeführt unter Verwendung eines Beckmann 990-Peptid-Synthetisators auf einem MBHA-Harz wie im Beispiel II beschrieben.

Das Peptid wurde als im wesentlichen rein nach TLC und HPLC gefunden.

Beispiel IX

Die Synthese von  $[D-Phe^1, D-NMA^2, D-Leu^{23}]$ -pGRF(1-44)-NH<sub>2</sub> mit der Formel

H-D-Phe-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-D-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-Ser-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-Gly-Ala-Arg-Val-Arg-Leu-NH<sub>2</sub>

wurde schrittweise durchgeführt unter Verwendung eines Beckmann 990-Peptid-Synthetisators auf einem MBHA-Harz wie allgemein von Vale et al. im US-Patent 4 292 313 beschrieben. Das Peptid wurde als im wesentlichen rein nach TLC und HPLC gefunden.

Beispiel X

Die Synthese von (pCl-Phe<sup>1</sup>, D-NMA<sup>2</sup>, D-Leu<sup>17,23</sup>, Asp<sup>25</sup>, Ile<sup>27</sup>)-rGRF (1-43)-OH mit der Formel

H-pCl-Phe-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Ser-Ser-Tyr-Arg-Arg-Ile-Leu-Gly-Gln-D-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-D-Leu-His-Asp-Ile-Ile-Asn-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-Arg-Ser-Arg-Phe-Asn-OH

wurde schrittweise durchgeführt unter Verwendung eines Beckmann 990-Peptid-Synthetisators auf einem chlormethyliertem Harz in der Weise, wie es allgemein im Beispiel I beschrieben wird. Das Peptid wurde als im wesentlichen rein nach TLC und HPLC gefunden.

Beispiel XI

Die Synthese von (D-NMA<sup>2</sup>, D-Asp<sup>3,25</sup>)-hGRF(1-32)-NH<sub>2</sub> mit der Formel

H-Tyr-D-NMA-D-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-D-Asp-Ile-Met-Ser-Arg-Gln-Gln-Gly-NH<sub>2</sub>

wurde schrittweise durchgeführt unter Verwendung eines Beckmann 990-Peptid-Synthetisators auf einem MBHA-Harz wie im Beispiel II beschrieben.

Das Analoge wurde als im wesentlichen rein nach TLC und HPLC gefunden.

Beispiel XII

Die Synthese von (D-Tyr<sup>1</sup>, D-NMA<sup>2</sup>, D-Asp<sup>3</sup>, D-Asn<sup>8</sup>, D-Tyr<sup>10</sup>, D-Ala<sup>15</sup>, D-Leu<sup>17,23</sup>, D-Asp<sup>25</sup>, D-Met<sup>27</sup>)-hGRF(1-29)-NH<sub>2</sub> mit der Formel

H-D-Tyr-D-NMA-D-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-D-Asn-Ser-D-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-D-Ala-Gln-D-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-D-Leu-Gln-D-Asp-Ile-D-Met-Ser-Arg-NH<sub>2</sub>

wurde schrittweise durchgeführt unter Verwendung eines Beckmann 990-Peptid-Synthetisators auf einem MBHA-Harz wie im Beispiel II beschrieben.

Das Analoge wurde als im wesentlichen rein nach TLC und HPLC gefunden.

Beispiel XIII

Die Synthese von (D-His<sup>1</sup>, D-NMA<sup>2</sup>, D-Ser<sup>8</sup>, D-Leu<sup>23</sup>, Nle<sup>27</sup>)-rGRF(1-43)-OH mit der Formel

H-D-His-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-D-Ser-Ser-Tyr-Arg-Arg-Ile-Leu-Gly-Gln-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-D-Leu-His-Glu-Ile-Nle-Asn-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-Arg-Ser-Arg-Phe-Asn-OH

wurde schrittweise durchgeführt unter Verwendung eines Beckmann 990-Peptid-Synthetisators auf einem chlormethylierten Harz in der Weise, wie es allgemein im Beispiel 1 beschrieben wurde. Das Peptid wurde als im wesentlichen rein nach TLC und HPLC gefunden.

Beispiel XIV

Die Synthese eines rGRF-Analog-Fragmentes und zwar von (N<sup>ω</sup>-MeTyr<sup>1</sup>, D-NMA<sup>2</sup>, D-Glu<sup>25</sup>)-rGRF(1-29)-NH<sub>2</sub> mit der Formel

N<sup>ω</sup>-MeTyr-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Ser-Ser-Tyr-Arg-Arg-Ile-Leu-Gly-Gln-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-His-D-Glu-Ile-Met-Asn-Arg-NH<sub>2</sub>

wurde schrittweise durchgeführt unter Verwendung eines Beckmann 990-Peptid-Synthetisators auf einem MBHA-Harz wie im Beispiel II beschrieben. Das Peptid wurde als im wesentlichen rein nach TLC und HPLC gefunden.

Beispiel XV

Die Synthese von (C<sup>α</sup>-MeLeu<sup>1</sup>, D-NMA<sup>2</sup>, D<sup>1</sup>Leu<sup>23</sup>, D-Glu<sup>25</sup>, Ala<sup>27</sup>)-rGRF-(Val<sup>44</sup>)-NH<sub>2</sub> mit der Formel

H-C<sup>α</sup>MeLeu-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Ser-Ser-Tyr-Arg-Arg-Ile-Leu-Gly-Gln-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-D-Leu-His-D-Glu-Ile-Ala-Asn-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-Arg-Ser-Arg-Phe-Asn-Val-NH<sub>2</sub>

wurde schrittweise durchgeführt unter Verwendung eines Beckmann 990-Peptid-Synthetisators auf einem MBHA-Harz wie im Beispiel II beschrieben. Das Peptid wurde als im wesentlichen rein nach TLC und HPLC gefunden.

Beispiel XVI

Die Synthese von (D-NMA<sup>2</sup>, Nle<sup>27</sup>)-pGRF(1-29)-NH<sub>2</sub> mit der Formel



H-Tyr-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Ser-Arg-NH<sub>2</sub>

wurde schrittweise durchgeführt unter Verwendung eines Beckmann 990-Peptid-Synthetisators auf einem MBHA-Harz wie allgemein von Vale et al. im US-Patent 4 292 313 beschrieben. Das Peptid wurde als im wesentlichen rein nach TLC und NPLC gefunden.

#### Beispiel XVII

Die Synthese von (D-Tyr<sup>1</sup>, D-NMA<sup>2</sup>, D-Leu<sup>23</sup>)-bGRF(1-44)-NH<sub>2</sub> mit der Formel

H-D-Tyr-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-D-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-Met-Asn-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-Gly-Ala-Arg-Val-Arg-Leu-NH<sub>2</sub>

wurde schrittweise durchgeführt unter Verwendung eines Beckmann 990-Peptid-Synthetisators auf einem MBHA-Harz wie allgemein von Vale et al. im US-Patent 4 292 313 beschrieben. Das Peptid wurde als im wesentlichen rein nach TLC und HPLC gefunden.

#### Beispiel XVIII

Die Synthese von (D-NMA<sup>2</sup>, Nle<sup>27</sup>)-bGRF(1-29)-NH<sub>2</sub> mit der Formel

H-Tyr-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Asn-Arg-NH<sub>2</sub>

wurde schrittweise durchgeführt unter Verwendung eines Beckmann 990-Peptid-Synthetisators auf einem MBHA-Harz wie allgemein von Vale et al. im US-Patent 4 292 313 beschrieben. Das Peptid wurde als im wesentlichen rein nach TLC und HPLC gefunden.

#### Beispiel XIX

Die Synthese von (C<sup>14</sup>-MePhe<sup>1</sup>, D-NMA<sup>2</sup>, Val<sup>27</sup>)-rGRF-(Leu<sup>44</sup>)-NH<sub>2</sub> mit der Formel

H-C<sup>14</sup>-MePhe-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Ser-Ser-Tyr-Arg-Arg-Ile-Leu-Gly-Gln-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-His-Glu-Ile-Val-Asn-Arg-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-Arg-Ser-Arg-Phe-Asn-Leu-NH<sub>2</sub>

wurde schrittweise durchgeführt unter Verwendung eines Beckmann 990-Peptids-Synthetisators auf einem MBHA-Harz wie im Beispiel II beschrieben. Das Peptid wurde als im wesentlichen rein nach TLC und HPLC gefunden.

#### Beispiel XX

Die Synthese von (D-Met<sup>1</sup>, D-NMA<sup>2</sup>, Tyr<sup>18</sup>)-bGRF(1-44)-NH<sub>2</sub> mit der Formel

H-D-Met-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-'Asp-Ili-Met-Asn-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-Gly-Ala-Arg-Val-Arg-Leu-NH<sub>2</sub>

wurde schrittweise durchgeführt unter Verwendung eines Beck-

mann 990-Peptid-Synthetisators auf einem MBHA-Harz wie allgemein von Vale et al. im US-Patent 4 292 313 beschrieben. Das Peptid wurde als im wesentlichen rein nach TLC und HPLC gefunden.

Beispiel XXI

Die Synthese von (N<sup>4</sup>MeHis<sup>1</sup>, D-NMA<sup>2</sup>, Nle<sup>27</sup>)-pGRF (1-29)-NH<sub>2</sub> mit der Formel

H-N<sup>4</sup>MeHis-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Ser-Arg-NH<sub>2</sub>

wurde schrittweise durchgeführt unter Verwendung eines Beckmann 990-Peptid-Synthetisators auf einem MBHA-Harz wie allgemein von Vale et al. im US-Patent 4 292 313 beschrieben. Das Peptid wurde als im wesentlichen rein nach TLC und HPLC gefunden.

Beispiel XXII

Die Synthese des hGRF-Analogfragments (D-NMA<sup>2</sup>, Leu<sup>27</sup>, Asn<sup>28</sup>)-hGRF(1-32)-NH<sub>2</sub> mit der Formel

H-Tyr-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Leu-Asn-Arg-Gln-Gln-Gly-NH<sub>2</sub>

wurde schrittweise durchgeführt unter Verwendung eines Beckmann 990-Peptid-Synthetisators auf einem MBHA-Harz wie im Beispiel II beschrieben. Das Analoge wurde als im wesentlichen

rein nach TLC und HPLC gefunden. Die Synthese wurde zweimal wiederholt und man erhielt (D-NMA<sup>2</sup>, Nva<sup>27</sup>)-hGRF(1-32)-NH<sub>2</sub>.

Beispiel XXIII

Die Synthese von (D-NMA<sup>2</sup>, Lys<sup>12</sup>, Nle<sup>27</sup>)-rGRF(1-29)-NH<sub>2</sub>, mit der Formel

H-His-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Ser-Ser-Tyr-Arg-Lys-Ile-Leu-Gly-Gln-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-His-Glu-Ile-Nle-Asn-Arg-NH<sub>2</sub>

wurde schrittweise durchgeführt unter Verwendung eines Beckmann 990-Peptid-Synthetisators auf einem MBHA-Harz wie im Beispiel II beschrieben. Das Peptid wurde als im wesentlichen rein nach TLC und HPLC gefunden. Die Synthese wurde zweimal wiederholt, und man erhielt (D-NMA<sup>2</sup>, Val<sup>13</sup>), Ser<sup>18</sup>)-rGRF(1-29)-NH<sub>2</sub>.

Beispiel XXIV

Die Synthese des hGRF-Analogfragments (D-NMA<sup>2</sup>, Arg<sup>12</sup>, Ile<sup>27</sup>)-hGRF(1-29)-NH<sub>2</sub> mit der Formel

H-Tyr-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Shr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Arg-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Ile-Ser-Arg-NH<sub>2</sub>

wurde schrittweise durchgeführt unter Verwendung eines Beckmann 990-Peptid-Synthetisators auf einem MBHA-Harz wie im Beispiel II beschrieben. Das Peptid wurde als im wesentlichen rein nach TLC und HPLC gefunden.

Beispiel XXV

Die Synthese von (D-Phe<sup>1</sup>, D-NMA<sup>2</sup>, D-Ala<sup>15</sup>, D-Met<sup>27</sup>)-hGRF (1-29) mit der Formel

H-D-Phe-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-D-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-D-Met-Ser-Arg-NH<sub>2</sub>

wurde schrittweise durchgeführt unter Verwendung eines Beckmann 990-Peptid-Synthetisators auf einem MBHA-Harz wie im Beispiel II beschrieben. Das Analoge wurde als im wesentlichen rein nach TLC und HPLC gefunden.

Beispiel XXVI

Die Synthese von (D-NMA<sup>2</sup>, His<sup>24</sup>, D-Asp<sup>25</sup>)-hGRF(1-32)-NH<sub>2</sub> mit der Formel

H-Tyr-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-His-D-Asp-Ile-Met-Ser-Arg-Gln-Gln-Gly-NH<sub>2</sub>

wurde schrittweise durchgeführt unter Verwendung eines Beckmann 990-Peptid-Synthetisators auf einem MBHA-Harz wie im Beispiel II beschrieben. Das Analoge wurde als im wesentlichen rein nach TLC und HPLC gefunden.

Beispiel XXVII

Die Synthese von (N<sup>ω</sup>-MeHis<sup>1</sup>, D-NMA<sup>2</sup>, D-Asp<sup>25</sup>)-rGRF(1-29)-NH<sub>2</sub> mit der Formel

N<sup>4</sup>-MeHis-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Ser-Ser-Tyr-Arg-Arg-Ile-Leu-Gly-Gln-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-His-D-Asp-Ile-Met-Asn-Arg-NH<sub>2</sub>

wurde schrittweise durchgeführt unter Verwendung eines Beckmann 990-Peptid-Synthetisators auf einem MBHA-Harz wie im Beispiel II beschrieben. Das Peptid wurde als im wesentlichen rein nach TLC und HPLC gefunden.

#### Beispiel XXVIII

Die Synthese von (D-His<sup>1</sup>, D-NMA<sup>2</sup>, D-Asn<sup>8</sup>, Nle<sup>27</sup>, Ser<sup>34</sup>, Ala<sup>40</sup>)-rGRF(1-43)-OH mit der Formel

H-D-His-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-D-Asn-Ser-Tyr-Arg-Arg-Ile-Leu-Gly-Gln-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-His-Glu-Ile-Nle-Asn-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Ser-Asn-Gln-Glu-Gln-Arg-Ala-Arg-Phe-Asn-OH

wurde schrittweise durchgeführt unter Verwendung eines Beckmann 990-Peptid-Synthetisators auf einem chlormethylierten Harz in der Weise, wie es allgemein im Beispiel I beschrieben wurde; das Peptid wurde als im wesentlichen rein nach TLC und HPLC gefunden.

#### Beispiel XXIX

Die Synthese von (D-Ala<sup>2</sup>, D-Asp<sup>3</sup>, D-Arg<sup>29</sup>)-hGRF(1-32)-NH<sub>2</sub> mit der Formel

H-Tyr-D-Ala-D-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-'Asp-Ile-Met-Ser-D-Arg-Gln-Gln-Gly-NH<sub>2</sub>

wurde schrittweise durchgeführt unter Verwendung eines Beckmann 990-Peptid-Synthetisators auf einem MBHA-Harz wie im Beispiel II beschrieben. Das Analoge wurde als im wesentlichen rein nach TLC und HPLC gefunden.

Beispiel XXX

Die Synthese von (D-Tyr<sup>1</sup>, D-NMA<sup>2</sup>, D-Asp<sup>3,25</sup>, D-Asn<sup>8</sup>, D-Tyr<sup>10</sup>, D-Ala<sup>15</sup>, D-Leu<sup>14,17,23</sup>, D-Met<sup>27</sup>, D-Arg<sup>29</sup>)--hGRF(1-29)-NH<sub>2</sub> mit der Formel

H-D-Tyr-D-NMA-D-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-D-Asn-Ser-D-Tyr-Arg-Lys-Val-'D-Leu-D-Ala-Gln-D-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-D-Leu-Gln-D-Asp-Ile-D-Met-Ser-D-Arg-NH<sub>2</sub>

wurde schrittweise durchgeführt unter Verwendung eines Beckmann 990-Peptid-Synthetisators auf einem MBHA-Harz wie im Beispiel II beschrieben. Das Analoge wurde als im wesentlichen rein nach TLC und HPLC gefunden.

Beispiel XXXI

Die Synthese von (D-His<sup>1</sup>, D-NMA<sup>2</sup>, D-Ser<sup>8</sup>, D-Leu<sup>14</sup>, Nle<sup>26</sup>)-rGRF(1-43)-NHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> mit der Formel

H-D-His-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-D-Ser-Ser-Tyr-Arg-Arg-Ile-D-Leu-Gly-Gln-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-His-Glu-Ile-Nle-Asn-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-Arg-Ser-Arg-Phe-Asn-NHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>

wurde schrittweise durchgeführt unter Verwendung eines Beckmann 990-Peptid-Synthetisators auf einem chlormethylierten Harz in der Weise, wie es allgemein im Beispiel I beschrieben wurde.

Das Peptid wurde als im wesentlichen rein nach TLC und HPLC gefunden.

Beispiel XXXII

Die Synthese des rGRF Analogfragments ( $N^{\omega}$ MeTyr<sup>1</sup>, D-Leu<sup>14</sup>, D-Glu<sup>25</sup>)-rGRF(1-27)-NH<sub>2</sub> mit der Formel

$N^{\omega}$ MeTyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Ser-Ser-Tyr-Arg-Arg-Ile-D-Leu-Gly-Gln-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-His-D-Glu-Ile-Met-NH<sub>2</sub>

wurde schrittweise durchgeführt unter Verwendung eines Beckmann 990-Peptid-Synthetisators auf einem MBHA-Harz wie im Beispiel II beschrieben. Das Peptid wurde als im wesentlichen rein nach TLC und HPLC gefunden.

Beispiel XXXIII

Die Synthese von (D-Tyr<sup>1</sup>, D-NMA<sup>2</sup>, D-Leu<sup>14</sup>, D-Arg<sup>29</sup>)-pGRF(1-44)-NH<sub>2</sub> mit der Formel

H-D-Tyr-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-D-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-Ser-D-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-Gly-Ala-Arg-Val-Arg-Leu-NH<sub>2</sub>

wurde schrittweise durchgeführt unter Verwendung eines Beckmann 990-Peptid-Synthetisators auf einem MBHA-Harz wie allgemein von Vale et al. im US-Patent 4 292 313 beschrieben. Das Peptid wurde als im wesentlichen rein nach TLC und HPLC gefunden.



Beispiel XXXIV

Die Synthese von (C<sup>α</sup>-MeLeu<sup>1</sup>, D-NMA<sup>2</sup>, D-Leu<sup>14</sup>, D-Glu<sup>25</sup>, Ile<sup>27</sup>)-rGRF(1-27)-NH<sub>2</sub> mit der Formel

H-C<sup>α</sup>-MeLeu-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Ser-Ser-Tyr-Arg-Arg-Ile-D-Leu-Gly-Gln-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-His-D-Glu-Ile-Ile-NH<sub>2</sub>

wurde schrittweise durchgeführt unter Verwendung eines Beckmann 990-Peptid-Synthetisators auf einem MBHA-Harz wie im Beispiel II beschrieben. Das Peptid wurde als im wesentlichen rein nach TLC und HPLC gefunden.

Beispiel XXXV

Die Synthese von (D-Tyr<sup>1</sup>, D-NMA<sup>2</sup>, D-Leu<sup>14</sup>, D-Arg<sup>29</sup>, Ala<sup>42</sup>)-bGRF(1-44)-NH<sub>2</sub> mit der Formel

H-D-Tyr-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-D-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asn-Ile-Met-Asn-D-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-Gly-Ala-Arg-Ala-Arg-Leu-NH<sub>2</sub>

wurde schrittweise durchgeführt unter Verwendung eines Beckmann 990-Peptid-Synthetisators auf einem MBHA-Harz wie allgemein von Vale et al. im US-Patent 4 292 313 beschrieben. Das Peptid wurde als im wesentlichen rein nach TLC und HPLC gefunden.

Beispiel XXXVI

Die Synthese von (D-NMA<sup>2</sup>, Nle<sup>27</sup>, D-Arg<sup>29</sup>)-pGRF(1-29)-NH<sub>2</sub> mit

der Formel

H-Tyr-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Ser-D-Arg-NH<sub>2</sub>

wurde schrittweise durchgeführt unter Verwendung eines Beckmann 990-Peptid-Synthetisators auf einem MBHA-Harz wie allgemein von Vale et al. im US-Patent 4 292 313 beschrieben. Das Peptid wurde als im wesentlichen rein nach TLC und HPLC gefunden. Das Acetatsalz wurde anschließend durch Lösen des Peptids in Wasser und Zusatz von 1 N Essigsäure hergestellt. Die erhaltene Lösung wurde lyophilisiert, um das Essigsäuresalz zu erhalten.

Beispiel XXXVII

Die Synthese des hGRF-Analogen (D-NMA<sup>2</sup>, Nle<sup>27</sup>, D-Arg<sup>29</sup>)-hGRF(1-29)-NH<sub>2</sub> mit der Formel

H-Tyr-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Ser-D-Arg-NH<sub>2</sub>

wurde schrittweise durchgeführt unter Verwendung eines Beckmann 990-Peptids-Synthetisators auf einem MBHA-Harz wie im Beispiel II beschrieben. Das Analoge wurde als im wesentlichen rein nach TLC und HPLC gefunden. Die Synthese wurde wiederholt, um (D-NMA<sup>2</sup>, D-Leu<sup>14</sup>, Nle<sup>27</sup>, D-Arg<sup>29</sup>)-hGRF(1-32)-NH<sub>2</sub> herzustellen.

Beispiel XXXVIII

Die Synthese von (D-Leu<sup>14</sup>, Nle<sup>27</sup>)-rGRF(1-29)-NH<sub>2</sub> mit der Formel

H-His-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Ser-Ser-Tyr-Arg-Arg-Ile-D-Leu-Gly-Gln-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-His-Glu-Ile-Nle-Asn-Arg-NH<sub>2</sub>

wurde schrittweise durchgeführt unter Verwendung eines Beckmann 990-Peptid-Synthetisators auf einem MBHA-Harz wie im Beispiel II beschrieben. Das Peptid wurde als im wesentlichen rein nach TLC und HPLC gefunden. Die Synthese wurde wiederholt, um zu (D-NMA<sup>2</sup>, D-Leu<sup>14</sup>, Nle<sup>27</sup>)-rGRF(1-29)-NH<sub>2</sub> zu gelangen.

Beispiel XXXIX

Die Synthese des hGRF-Analogen (D-NMA<sup>2</sup>, Nle<sup>27</sup>, Asn<sup>28</sup>)-hGRF(1-29)-NH<sub>2</sub> mit der Formel

H-Tyr-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Asn-Arg-NH<sub>2</sub>

wurde schrittweise durchgeführt unter Verwendung eines Beckmann 990-Peptid-Synthetisators auf einem MBHA-Harz wie im Beispiel II beschrieben. Das Peptid wurde als im wesentlichen rein nach TLC und HPLC gefunden.

Beispiel XL

Die Synthese von (D-Ala<sup>2</sup>, D-Glu<sup>25</sup>, Nle<sup>27</sup>, D-Arg<sup>29</sup>)-hGRF(1-29)-NH<sub>2</sub> mit der Formel

H-Tyr-D-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-D-Glu-Ile-Nle-Ser-D-Arg-NH<sub>2</sub>

wurde schrittweise durchgeführt unter Verwendung eines Beckmann 990-Peptid-Synthetisators auf einem MBHA-Harz wie im Beispiel II beschrieben. Nach Entfernung aus dem Harz und Entschützen wird das Peptid mit 1N Essigsäure behandelt, um zum Acetatsalz vor der Lyophilisierung herzustellen. Das Peptid wurde als im wesentlichen rein nach TLC und HPLC gefunden.

#### Beispiel XLI

Die Synthese von (Nle<sup>27</sup>, D-Arg<sup>29</sup>)-rGRF(1-29)-NH<sub>2</sub> mit der Formel

H-His-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Ser-Ser-Tyr-Arg-Arg-Ile-Leu-Gly-Gln-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-His-Glu-Ile-Nle-Asn-D-Arg-NH<sub>2</sub>

wurde schrittweise durchgeführt unter Verwendung eines Beckmann 990-Peptid-Synthetisators auf einem MBHA-Harz wie im Beispiel II beschrieben. Das Peptid wurde als im wesentlichen rein nach TLC und HPLC gefunden.

#### Beispiel XLII

Die Synthese von (pCl-Phe<sup>1</sup>, D-NMA<sup>2</sup>, D-Leu<sup>14</sup>, Nle<sup>27</sup>, D-Arg<sup>29</sup>)-rGRF(1-43)-OH mit der Formel

H-pCl-Phe-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Ser-Ser-Tyr-Arg-Arg-Ile-D-Leu-Gly-Gln-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-His-Asp-Ile-Nle-Asn-D-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-Arg-Ser-Arg-Phe-Asn-OH

wurde schrittweise durchgeführt unter Verwendung eines Beckmann 990-Peptid-Synthetisators auf einem chlormethylierten Harz in der Weise, wie es allgemein im Beispiel I beschrieben wurde. Das Peptid wurde als im wesentlichen rein nach TLC und HPLC gefunden.

#### Beispiel XLIII

Die Synthese des hGRF-Analogfragmentes (D-NMA<sup>2</sup>, D-Tyr<sup>10</sup>, Nle<sup>27</sup>)-hGRF(1-29)-NH<sub>2</sub> mit der Formel H-Tyr-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-D-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Ser-Arg-NH<sub>2</sub>

wurde schrittweise durchgeführt unter Verwendung eines Beckmann 990-Peptid-Synthetisators auf einem MBHA-Harz wie im Beispiel II beschrieben. Das Peptid wurde als im wesentlichen rein nach TLC und HPLC gefunden. Die Synthese wurde wiederholt, um zu (D-NMA<sup>2</sup>, D-Leu<sup>17</sup>, Nle<sup>27</sup>)-hGRF(1-27)-NH<sub>2</sub> zu gelangen.

#### Beispiel XLIV

Die Synthese des hGRF-Analogfragmentes (D-NMA<sup>2</sup>, Nle<sup>27</sup>)-hGRF(1-29)-NHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> mit der Formel

H-Tyr-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Ser-Aeg-NHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>

wurde schrittweise durchgeführt unter Verwendung eines Beckmann 990-Peptid-Synthetisators auf einem chlormethylierten Harz in der Weise, wie es allgemein im Beispiel I beschrieben wurde. Das Peptid wurde aus dem Harz durch Ammonolyse mittels

Ethylenaminbehandlung abgespalten. Das Peptid wurde als im wesentlichen rein nach TLC und HPLC gefunden.

Beispiel XLV

Die Synthese von (D-Leu<sup>14</sup>), Nle<sup>27</sup>)-rGRF(1-29)-NH<sub>2</sub> mit der Formel

H-His-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Ser-Ser-Tyr-Arg-Arg-Ile-D-Leu-Gly-Gln-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-His-Glu-Ile-Nle-NH<sub>2</sub>

wurde schrittweise durchgeführt unter Verwendung eines Beckmann 990-Peptid-Synthetisators auf einem MBHA-Harz wie im Beispiel II beschrieben. Das Peptid wurde als im wesentlichen rein nach TLC und HPLC gefunden.

Beispiel XLVI

Die Synthese des hGRF-Analogfragmentes (D-Tyr<sup>1</sup>, D-NMA<sup>2</sup>, Nle<sup>27</sup>, D-Arg<sup>29</sup>)-hGRF(1-29)-NH<sub>2</sub> mit der Formel

H-D-Tyr-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Ser-D-Arg-NH<sub>2</sub>

wurde schrittweise durchgeführt unter Verwendung eines Beckmann 990-Peptid-Synthetisators auf einem MBHA-Harz wie im Beispiel II beschrieben. Das Peptid wurde als im wesentlichen rein nach TLC und HPLC gefunden. Die Synthese wurde zweimal wiederholt, um zu (Met<sup>1</sup>, D-NMA<sup>2</sup>, Nle<sup>27</sup>)-hGRF(1-27)-NH<sub>2</sub> zu gelangen.

Beispiel XLVII

Die Synthese des hGRF-Analogfragmentes (D-N<sup>ε</sup>MeTyr, D-NMA<sup>2</sup>,

Nle<sup>27</sup>)-hGRF(1-29)-NH<sub>2</sub> mit der Formel

H-D-N MeTyr-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-  
Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys,-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-  
Ser-Arg-NH<sub>2</sub>

wurde schrittweise durchgeführt unter Verwendung eines Beckmann 990-Peptid-Synthetisators auf einem MBHA-Harz wie im Beispiel II beschrieben. Das Peptid wurde als im wesentlichen rein nach TLC und HPLC gefunden.

#### Beispiel XLVIII

Die Synthese des hGRF-Analogfragmentes (His<sup>1</sup>, D-NMA<sup>2</sup>, Nle<sup>27</sup>)-hGRF(1-29)-NH<sub>2</sub> mit der Formel

H-His-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-  
Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Ser-Arg-  
NH<sub>2</sub>

wurde schrittweise durchgeführt unter Verwendung eines Beckmann 990-Peptid-Synthetisators auf einem MBHA-Harz wie im Beispiel II beschrieben. Das Peptid wurde nach TLC und HPLC als im wesentlichen rein angesehen.

Die Synthese wurde zweimal wiederholt, um zu (His<sup>1</sup>, Nle<sup>27</sup>, D-Arg<sup>29</sup>)-hGRF(1-27)-NH<sub>2</sub> zu gelangen.

Die in den Beispielen hergestellten Peptide verglich man mit synthetischen hpGRF(1-40)-OH in vitro-Assays, wobei gefunden wurde, daß sie eine allgemein größere Potenz für die GH-Sekretion und ähnliche Eigenaktivitäten zeigten. Alle diese Peptide sind als biologisch aktiv anzusehen und potentiell nützlich für

die Stimulierung der Freisetzung von GH durch die Hypophyse.

Um die Effektivität verschiedener synthetischer Peptide zur Beschleunigung der Freisetzung von Wachstumshormonen zu bestimmen, wurden in vitro-Assays durchgeführt unter Verwendung von synthetischem hpGRF(1-40)-OH als Standard in nebeneinanderliegendem Vergleich mit äquimolaren Konzentrationen der verschiedenen anderen synthetisierten Analoge und Fragmente. Es wurden Kulturen verwendet, die Zellen von rattenhypophysen enthielten, die man 3 bis 5 Tage vorher entfernt hatte. Kulturen, die also optimal für die Sekretion von Wachstumshormonen zu betrachten sind, werden für die Vergleichsversuche eingesetzt, wie es allgemein von Vale et al. in Endocrinology, 91 (1972) 562-572 und noch eingehender von Vale et al. in Endocrinology 112, 1553-55 (1983) beschrieben worden ist. Die Inkubation mit der zu testenden Substanz erfolgt über 3 bis 4 Stunden und Aliquote des Kulturmediums werden entfernt und behandelt, um deren Gehalte an immunoreaktiver GH(ir GH) durch eine gut charakterisierende Radioimmunoassay zu messen. Die Ergebnisse dieses Vergleichstests für äquimolare Konzentrationen sind in Tabelle I aufgeführt.

Tabelle I

| <u>Peptid</u>  | <u>Vergleich (%)</u> |
|--|----------------------|
| hGRF(1-40)-OH<br>(Standard für diesen Test)  | 100 %                |
| (D-NMA <sup>2</sup> , Nle <sup>27</sup> )-hGRF(1-29)-NH <sub>2</sub>                     | 1330 %               |
| (D-NMA <sup>2</sup> , Nle <sup>27</sup> )-hGRF(1-27)-NH <sub>2</sub>                     | 150 %                |
| (D-NMA <sup>2</sup> , Nle <sup>27</sup> )-hGRF(1-29)-NH <sub>2</sub> t                   | 1130 %               |
| (D-NMA <sup>2</sup> , Nle <sup>27</sup> , Asn <sup>28</sup> )-hGRF(1-29)-NH <sub>2</sub> | 520 %                |
| (D-Leu <sup>14</sup> , Nle <sup>27</sup> )-rGRF(1-29)-NH <sub>2</sub>                    | 120 %                |
| (Nle <sup>27</sup> , D-Arg <sup>29</sup> )-rGRF(1-29)-NH <sub>2</sub>                    | 386 %                |



|   |       |
|---|-------|
| (D-NMA <sup>2</sup> , Nle <sup>27</sup> )-rGRF(1-29)-NH <sub>2</sub>  | 900 % |
| (D-NMA <sup>2</sup> , D-Tyr <sup>10</sup> , Nle <sup>27</sup> )-hGRF(1-29)-NH <sub>2</sub>                      | 270 % |
| (D-NMA <sup>2</sup> , Nle <sup>27</sup> , D-Arg <sup>29</sup> )-hGRF(1-29)-NH <sub>2</sub>                      | 580 % |
| (D-Tyr <sup>1</sup> , D-NMA <sup>2</sup> , Nle <sup>27</sup> , D-Arg <sup>29</sup> )-hGRF(1-29)-NH <sub>2</sub> | 60 %  |
| (D-N <sup>ω</sup> MeTyr <sup>1</sup> , D-NMA <sup>2</sup> , Nle <sup>27</sup> )-hGRF(1-29)-NH <sub>2</sub>      | 30 %  |
| (His <sup>1</sup> , D-NMA <sup>2</sup> , Nle <sup>27</sup> )-hGRF(1-29)-NH <sub>2</sub>                         | 260 % |

In vitro Tests dieser synthetischen Peptide zeigen, daß jedes dieser die volle biologische Eigenaktivität von hpGRF(1-40)-OH aufweist. Die minimale effektive Konzentration für [D-NMA<sup>2</sup>, Nle<sup>27</sup>]-hpGRF(1-29)-NH<sub>2</sub> ist etwas 1 picomolar.

Zusätzlich zu den in vitro-Tests für die Sekretion von Wachstumshormonen wurden über in vivo-Experimente die synthetischen Peptide intravenös in Urethan-anästetisierte männliche Ratten injiziert und bestimmt, daß sie die spontane GH-Sekretion ohne Beeinflussung der Wirkung auf die exogene GRF unterdrücken. Es wurden Blutproben genommen unmittelbar vorher und 10, 20 und 90 Minuten nach den Injektionen. GH-Spiegel im Blut, gemessen durch Radioimmunoassay, zeigten, daß synthetisches [D-NMA<sup>2</sup>, Nle<sup>27</sup>]-hGRF(1-29)-NH<sub>2</sub> annähernd sechsmal wirksamer als hGRF(1-40)-OH ist, im Hinblick auf Blutspiegel von Hypophysen-GH bei Messung sowohl bei 10 als auch bei 30 Minuten nach i.v.-Injektion. Andere bekannte in vivo-Tests von GRF, die für die Bestimmung der Sekretion von GH als wirkungsvoll bekannt sind, sind für die Bestätigung dieser Ergebnisse eingesetzt worden. Dosierungen zwischen etwa 50 Nanogramm und etwa 5 Mikrogramm dieser Peptide pro kg Körpermasse sind zum Hervorrufen der GH-Sekretion als wirkungsvoll anzusehen. Einige Peptide, die in vitro biologische Wirksamkeit etwa gleich oder leicht geringer als der Standard, zeigten eine wesentlich größere in vivo Wirksamkeit.

Derartige synthetische hpGRF-Analoga und möglicherweise rGRF- und pGRF-Analoga sollten für die Anwendung beim Menschen als

nützlich angesehen werden, wenn der Arzt die GH-Produktion fördern will. Die Stimulierung der GH-Sekretion durch derartige Analoge ist bei Patienten mit vollständigem oder relativem GH-Mangel hervorgerufen durch Unterproduktion endogener GRF, von Interesse. Weiterhin ist es wahrscheinlich, daß steigende GH-Sekretion und damit einhergehende Steigerung des Wachstums bei Menschen oder Tieren mit normalen GH-Spiegeln erreicht werden kann. Darüber hinaus sollte die Verabreichung den Körperfettgehalt und andere GH-abhängige metabolische, immunologische und Entwicklungsprozesse verändern. Beispielsweise können diese Analoge als Mittel zur Stimulierung anabolischer Prozesse bei Menschen unter Zuständen, wie sie in der Folge von Verbrennungen auftreten, nützlich sein. Ein weiteres Beispiel wäre, wenn diese Analogen warmblütigen Tieren der Tierproduktion verabreicht werden würden, z.B. Hühnchen, Truthühnchen, Schweinen, Ziegen, Rindern und Schafen, oder auch in der Aquikultur zur Aufzucht von Fischen oder anderen kaltblütigen Wasserlebewesen, wie Meeresschildkröten oder Aalen und amphibischen Lebewesen, um das Wachstum zu beschleunigen und das Verhältnis von Protein zu Fett zu steigern, erzielt durch Fütterung effektiver Peptidmengen.

Für die Verabreichung an Menschen sollten diese synthetischen Peptide eine Reinheit von wenigstens etwa 93 % haben, vorzugsweise von wenigstens 98 %. Für die Zwecke dieser Erfindung bezieht sich "Reinheit" auf das gewünschte Peptid, das die angegebene Masse % aller vorhandener Peptide und Peptidfragmente ausmacht. Für die Verabreichung derartiger synthetischer Peptide an Tiere und auch an industriell produzierte Tiere, um das Wachstum zu beschleunigen und den Fettgehalt zu verringern, kann eine niedrige Reinheit von etwa 5 % oder auch 0,01 % akzeptiert werden.

Diese synthetischen Peptide oder deren nichttoxischen Salze, kombiniert mit einem pharmazeutisch oder veterinär annehmbar-

ren Träger in einer pharmazeutischen Zusammensetzung, kann an Lebewesen einschließlich Menschen entweder intravenös, subkutan, intramuskulär, perkutan, z.B. intranasal oder eben oral verabreicht werden. Die Verabreichung kann durch einen Arzt erfolgen, um die Freisetzung von GH zu stimulieren, wenn der zu behandelnde Patient eine solche therapeutische Behandlung benötigt. Die erforderliche Dosis hängt von den Behandlungsbedingungen ab, von der Behandlungsgenauigkeit und von der Dauer der gewünschten Behandlung ab.

Derartige Peptide werden oft in Form nichttoxischer Salze verabreicht, beispielsweise als Säureadditionssalz oder Metallkomplexe, z.B. mit Zink, Eisen oder ähnlichen Metallen (die als Salze für die Zwecke dieser Anmeldung angesehen werden). Beispiele für solche Säureadditionssalze sind Hydrochlorid, Hydrobromid, Sulfat, Phosphat, Maleat, Acetat, Citrat, Benzoat, Succinat, Malat, Ascorbat, Tartrat und ähnliche. Wenn der aktive Bestandteil oral in Tablettenform zu verabreichen ist, kann die Tablette ein Bindemittel wie Tragacanth, Maisstärke, oder Gelatine enthalten; ein Verteilungsmittel wie Alginsäure; und ein Gleitmittel wie Magnesiumstearat. Wenn eine Verabreichung in flüssiger Form gewünscht wird, können Süßungsmittel und/oder Geschmacksstoffe verwendet werden, und intravenöse Verabreichung kann in isotonischer Salzlösung, Phosphatpufferlösungen oder ähnlichen bewirkt werden.

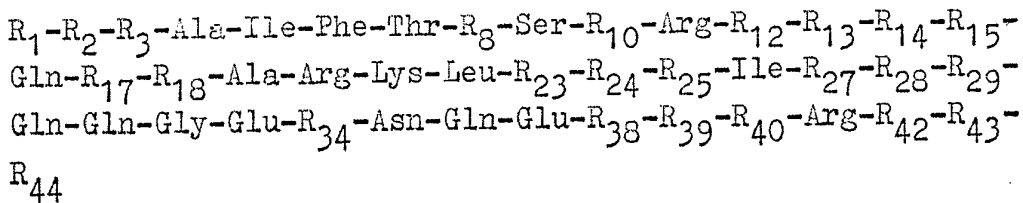
Die Peptide sollten an menschliche Patienten unter ärztlicher Aufsicht verabreicht werden. Pharmazeutische Zusammensetzungen enthalten üblicherweise das Peptid zusammen mit einem konventionellen, festen oder flüssigen, pharmazeutisch annehmbaren Träger. Üblicherweise liegt die parenterale Dosis des Peptids zwischen etwa 0,01 bis etwa 1 Mikrogramm pro Kilogramm Körpermasse des Patienten. Obgleich die Erfindung in Hinblick auf ihre bevorzugte Ausführungsform beschrieben worden ist, die die beste den Erfindern gegenwärtig bekannte Art darstellt,

sollte klar sein, daß zahlreiche Änderungen und Modifikationen für den Durchschnittsfachmann auf diesem Gebiet durchführbar sind, ohne den Schutzzumfang der Erfindung zu verlassen, die in den nachstehenden Ansprüchen dargelegt ist. Beispielsweise können Modifikationen in der Peptidkette, insbesondere Weglassungen erfolgen, beginnend am Carboxyende des Peptids bis etwa zur Position 27, gemäß bis heute bekannter experimenteller Praxis, um Peptide oder Peptidfragmente zu erhalten, die alle oder die wesentlichsten Teile der biologischen Potenz des Peptids aufweisen. Auch solche Peptide werden als im Schutzzumfang der Erfindung liegend betrachtet. Darüber hinaus können an einem oder beiden Kettenenden Additionen durchgeführt werden und/oder allgemein äquivalente Reste für natürlich auftretende Reste substituiert werden, wie das in der Peptidchemie allgemein bekannt ist, um zu anderen Analogen zu gelangen, die wenigstens einen wesentlichen Teil der Potenz der beanspruchten Polypeptide haben, ohne daß dabei der Schutzzumfang der Erfindung verlassen wird.

Darüber hinaus können Abweichungen hinsichtlich der bevorzugten  $-NH_2$ -Gruppe am C-Ende erfolgen in Übereinstimmung mit dem gegenwärtigen Stand der Technik, so kann z.B. der Carboxyteil des Aminosäurerestes am C-Ende das Radikal  $-COOR$ ,  $-CRO$ ,  $-CONHNHR$ ,  $-CON(R)(R')$  oder  $-CH_2OR$  sein, worin R und R' Niederalkyl, Fluorniederalkyl oder Wasserstoff darstellen, ohne daß dadurch für Veränderungen in Form äquivalenter synthetischer Peptide von der Erfindung abgewichen wird.

Erfindungsanspruch

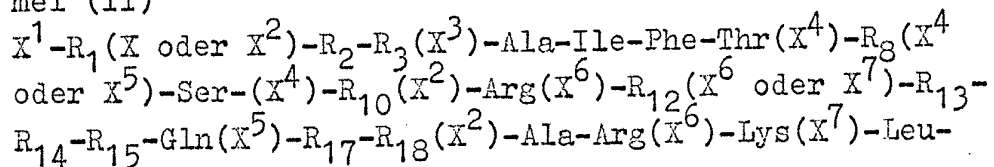
1. Verfahren zur Herstellung eines synthetischen Peptides mit der Sequenz



worin

R<sub>1</sub> Tyr, D-Tyr, Met, Phe, D-Phe, pCl-Phe, Leu, His oder Di-His darstellt mit entweder einer C<sup>α</sup>-Me- oder N<sup>α</sup>-Me-Substitution oder in unsubstituiertes Form; R<sub>2</sub> ist Ala, D-Ala oder D-NMA; R<sub>3</sub> ist Asp oder D-Asp; R<sub>8</sub> ist Ser, Asn, D-Ser oder D-Asn; R<sub>10</sub> ist Tyr oder D-Tyr; R<sub>12</sub> ist Arg oder Lys; R<sub>13</sub> ist Ile oder Val; R<sub>14</sub> ist Leu oder D-Leu; R<sub>15</sub> ist Gly oder D-Ala; R<sub>17</sub> ist Leu oder D-Leu; R<sub>18</sub> ist Tyr oder Ser; R<sub>23</sub> ist Leu oder D-Leu; R<sub>24</sub> ist His oder Gln; R<sub>25</sub> ist Glu, Asp, D-Glu oder D-Asp; R<sub>27</sub> ist Met, D-Met, Ala, Nle, Ile, Leu, Nva oder Val; R<sub>28</sub> ist Asn oder Ser; R<sub>29</sub> ist Arg oder D-Arg; R<sub>34</sub> ist Arg oder Ser; R<sub>38</sub> ist Gln oder Arg; R<sub>39</sub> ist Arg oder Gly; R<sub>40</sub> ist Ser oder Ala; R<sub>42</sub> ist Phe, Ala oder Val; R<sub>43</sub> ist Asn oder Arg; R<sub>44</sub> ist mit der Maßgabe, daß irgendeiner oder alle der Reste zwischen R<sub>28</sub> und einschließlich R<sub>44</sub> gestrichen werden können und der weiteren Maßgabe, daß R<sub>2</sub> D-NMA und/oder R<sub>14</sub> D-Leu und/oder R<sub>29</sub> D-Arg ist; oder eines seiner nichttoxischen Salze, gekennzeichnet dadurch, daß

a) ein Peptid mit zumindest einer Schutzgruppe und der Formel (II)



$R_{23}-R_{24}(X \text{ oder } X^5)-R_{25}(X^3)-Ile-R_{27}-R_{28}(X^4 \text{ oder } X^5)-$   
 $R_{29}(X^6)-Gln(X^5)-Gln(X^3)-Gly-Glu(X^3)-R_{34}(X^4 \text{ oder } X^6)-$   
 $Asn(X^5)-Gln(X^5)-Glu(X^3)-R_{38}(X^5 \text{ oder } X^6)-R_{39}(X^6)-R_{40}-$   
 $(X^4)-Arg(X^6)-R_{42}-R_{43}(X^5 \text{ oder } X^6)-R_{44}(X^8)-X^9$   
 worin  $X, X^1, X^2, X^3, X^4, X^5, X^6, X^7$  und  
 $X^8$  jeweils Wasserstoff oder eine Schutzgruppe sind;  
 $X^9$  ist entweder eine Schutzgruppe oder eine Haftbindung  
 an den Harzträger oder ist des  $-X^9$ , wobei in letzterem  
 Falle der Rest am C-Ende einen Carboxyteil hat, der Y  
 ist;

- b) Abspalten der Schutzgruppe oder -gruppen oder der Haftbindung vom Peptid der Formel (II); und
  - c) gewünschtenfalls Umwandeln des erhaltenen Peptids der Sequenz (I) in eines seiner nichttoxischen Salze.
2. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß  $R_2$  D-NMA ist.
  3. Verfahren nach Punkt 1 oder 2, gekennzeichnet dadurch, daß  $R_{29}$  D-Arg ist.
  4. Verfahren nach einem der Punkte 1-3, gekennzeichnet dadurch, daß  $R_{14}$  D-Leu ist.
  5. Verfahren nach einem der Punkte 1-4, gekennzeichnet dadurch, daß  $R_{25}$  D-Glu ist.
  6. Verfahren nach einem der Punkte 1 bis 5, gekennzeichnet dadurch, daß  $R_{27}$  Ile ist.
  7. Verfahren nach einem der Punkte 1 bis 6, gekennzeichnet dadurch, daß  $R_{17}$  D-Leu ist.

8. Verfahren nach einem der Punkte 1 bis 7, gekennzeichnet dadurch, daß  $R_{25}$  D-Asp ist.
9. Verfahren nach einem der Punkte 1 bis 4, gekennzeichnet dadurch, daß  $R_{17}$  D-Leu ist,  $R_{23}$  ist D-Leu,  $R_{25}$  ist Asp,  $R_{27}$  ist Nle und die Reste 30 bis 44 sind nicht vorhanden.