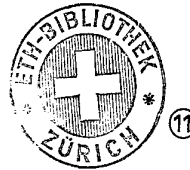




**12 PATENTSCHRIFT A5**



**615 904**

<p>21 Gesuchsnummer: 5474/76</p>	<p>73 Inhaber: Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V., Göttingen (DE)</p>
<p>61 Zusatz zu: 602 598</p>	
<p>22 Anmeldungsdatum: 30.04.1976</p>	
<p>30 Priorität(en): 03.10.1975 DE 2544348</p>	<p>72 Erfinder: Prof. Dr. Erich Wunsch, Tutzing (DE) Dr. Gerhard Wendlberger, Taufkirchen (DE) Dr. Ernst Jaeger, Germering (DE)</p>
<p>24 Patent erteilt: 29.02.1980</p>	
<p>45 Patentschrift veröffentlicht: 29.02.1980</p>	<p>74 Vertreter: Bovard &amp; Cie., Bern</p>

**54 Verfahren zur Herstellung von L-Leucin-13-Motilin.**

57 Es wird ein L-Leucin-13-Motilin hergestellt, das in 13-Stellung anstelle des L-Norleucins gemäss dem Hauptpatent ein L-Leucin enthält. Gegenüber dem bekannten Norleucin-Motilin hat das Leucin-Motilin den Vorteil, dass es bei gleich guter biologischer Aktivität einfach herstellbar ist und im Körper besonders leicht abgebaut wird.

## PATENTANSPRUCH

Verfahren zur Herstellung von L-Leucin-13-Motilin der Formel

H-Phe-Val-Pro-Ile-Phe-Thr-Tyr-Gly-Glu-Leu-Gln-Arg-  
(1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12)

Leu-Glu-Glu-Lys-Glu-Arg-Asn-Lys-Gly-Gln-OH  
(13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22),

dadurch gekennzeichnet, dass man die Teilsequenzen

Fragment I, bestehend aus Arginyl-(hydrobromid)-asparaglyl-Ne-tert.-butyloxy-carbonyl-lysyl-glycyl-glutamin-tert.-butylester (Aminosäuren 18–22),

Fragment II, bestehend aus N $\alpha$ -Benzyloxycarbonyl-glutamyl-( $\gamma$ -tert.-butylester)-glutamyl ( $\gamma$ -tert.-Butylester)-Ne-tert.-butyloxycarbonyl-lysyl-glutaminsäure- $\gamma$ -tert.-butylester (Aminosäuren 14–17),

Fragment III, bestehend aus N $\alpha$ -Benzyloxycarbonyl-N $\delta$ ,N $\omega$ -di-benzyloxycarbonyl-arginyl-leucin (Aminosäuren 12–13),

Fragment IV, bestehend aus N $\alpha$ -Benzyloxycarbonyl-glutamyl-( $\gamma$ -tert.-butylester)-leucyl-glutamin (Aminosäuren 9–11),

Fragment V, bestehend aus O-tert.-Butyl-threonyl-O-tert.-butyltyrosyl-glycyl (Aminosäuren 6–8) und

Fragment VI, bestehend aus N $\alpha$ -tert.-butyloxycarbonyl-phenylalanyl-valyl-propyl-isoleucyl-phenylalanin (Aminosäuren 1–5),

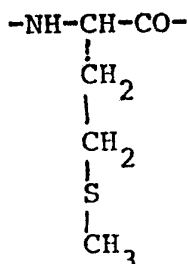
in denen alle Seitenkettenfunktionen der polyfunktionellen Aminosäuren leicht abspaltbare Gruppen tragen und die komplexen Funktionen des Arginins entweder durch N $\delta$ , $\omega$ -Diacylierung oder durch eine durch Salzbildung mit Bromwasserstoff bewirkte Protonierung maskiert ist, kondensiert, die Schutzgruppen abspaltet und das rohe L-Leucin-13-Motilin isoliert.

## UNTERANSPRÜCHE

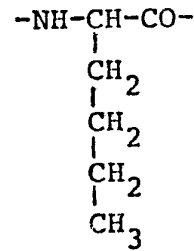
1. Verfahren nach Patentanspruch, dadurch gekennzeichnet, dass ein durch Aminoacylierung von L-Leucin (Aminosäure-13) mit Hilfe von N $\alpha$ ,N $\delta$ ,N $\omega$ -Tris-benzyloxycarbonyl-L-arginin-N-hydroxy-succinimidester (Aminosäure 12) erhältliches Fragment verwendet wird.

2. Verfahren nach Patentanspruch, dadurch gekennzeichnet, dass man das erhaltene L-Leucin-13-Motilin säulenchromatographisch reinigt an einem stark basischen Anionenaustauscherharz und danach an einem stark sauren Kationenaustauscherharz.

Die Erfindung betrifft eine Verbesserung und weitere Ausgestaltung des Hauptpatents, aus dem ein Verfahren zur Herstellung von L-Norleucin-13-Motilin bekannt ist, welches sich von dem natürlich vorkommenden Motilin dadurch unterscheidet, dass es als 13. von insgesamt 22 die Polypeptidkette aufbauenden Aminosäuren statt eines L-Methioninrestes der Formel

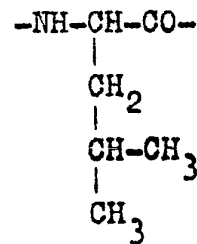


einen L-Norleucinrest der Formel



enthält. Das synthetische Motilinderivat hat praktisch die gleiche biologische Aktivität wie das natürliche Motilin (vgl. J. C. Brown in Demling et al. «Die Oberbaucheneinheit – The Upper Gastro-Intestinal Tract, a Functional Entity», Schattauer Verlag, Stuttgart – New York, 1974, Seiten 11–13).

Es wurde nun gefunden, dass entsprechend vorteilhafte Ergebnisse erzielbar sind, wenn in 13-Stellung des Motilins statt des L-Norleucinrestes ein L-Leucinrest der Formel



eingebaut wird. Gegenüber dem bekannten Norleucin-Motilin hat das Leucin-Motilin den Vorteil, dass es bei gleich guter biologischer Aktivität mit geringerem Kostenaufwand hergestellt werden kann, weil L-Leucin billiger ist als L-Norleucin, und dass es im Körper besonders leicht abgebaut wird, weil L-Leucin eine am Proteinaufbau massgebend beteiligte, natürlich vorkommende Aminosäure ist.

Motilin ist bekanntlich ein die motorische Aktivität sowohl in den Antrum- als auch in den Fundus-Drüsenarealen des Magens stimulierendes Polypeptid, das aus der Duodenalschleimhaut des Dünndarms von Schweinen isoliert wurde (vgl. z. B. «Can. J. Physiol. Pharmacol.», Bd. 49, 1971, Seiten 399–405, «Gastroenterology», Bd. 62, 1972, Seiten 401 bis 404 und «Can. J. Biochem.», Bd. 51, 1973, Seiten 533 bis 537), die Pepsinausschüttung ohne eine Änderung der H<sup>+</sup>-Sekretion stimuliert, und sich sowohl chemisch als auch physiologisch von den inzwischen aufgeklärten gastrointestinalen Hormonen unterscheidet. Dem Motilin kommt daher sowohl als Therapeutikum als auch als Diagnostikum eine besondere Bedeutung zu, da mit seiner Hilfe z. B. eine gesteuerte Pepsinausschüttung, beispielsweise mit dem Ziele der Bestimmung oder Isolierung des Pepsins oder der Regulierung des Pepsinspiegels, sowie eine gezielte Antikörperbildung bewirkt werden kann.

Die ursprüngliche Strukturaufklärung des Motilins ergab die Aminosäuresequenz -Met-Glu-Glu- in 13-14-15-Stellung, die an dem dem Hauptpatent zugrunde liegenden Prioritätstag als zutreffend angesehen wurde. Inzwischen wurde über eine Korrektur dieser Aminosäuresequenz berichtet, wonach in 14-Stellung Glutamin statt Glutaminsäure vorliegen soll, so dass obige Teilsequenz -Met-Gln-Glu- heissen müsste (vgl. «Can. J. Biochem.» Bd. 52, 1974, Seiten 7–8). Demnach wäre das aus dem Hauptpatent bekannte Motilinderivat mit 13-L-Norleucin-14-desamido-Motilin und das nunmehr beanspruchte Motilinderivat mit 13-L-Leucin-14-desamido-Motilin zu bezeichnen. Solange jedoch nicht mit Sicherheit feststeht, dass weitere Korrekturen der Aminosäuresequenz überflüssig sind, werden die bisherigen Bezeichnungen L-Norleucin-13-Motilin und L-Leucin-13-Motilin für die in 14-Stellung einen Glutaminsäurerest aufweisenden Motilinderivate beibehalten, noch

dazu, wo sich gezeigt hat, dass die Amidgruppe in der Seitenkette der 14-Glutaminsäure auf die biologische Aktivität keinen Einfluss hat (vgl. z. B. die rechte Spalte von Seite 8 der oben genannten Druckschrift «Can. J. Biochem.», Bd. 52, 1974).

Gemäss Hauptpatent wurde das bei allen Naturstoffen bestehende Problem, dass die Isolierung aus beispielsweise tierischen Organen unerhört zeit- und kostenaufwendig ist und nur in minimalen Ausbeuten gelingt, dadurch gelöst, dass eine Totalsynthese des Motilins durchgeführt wurde unter Ersatz des in 13-Stellung befindlichen Methioninrestes durch einen Norleucinrest, aus der Überlegung heraus, dass nach dem heutigen Stand der Peptidsynthese die mittelständige Arginyl-methionyl-Bindung (Aminosäuren 12 und 13 des Motilins) praktisch kaum synthetisierbar ist, andererseits jedoch das dem Motilin entsprechende Norleucin-13-Dokosa-peptid auf synthetischem Wege leichter zugänglich ist, eine vergleichsweise rasche Strukturermittlung gewährleistet und wichtige Aufschlüsse über die biologische Wirkungsspezifität des Methionins zu geben vermag.

Das in hohen Ausbeuten vollsynthetisch hergestellte L-Norleucin-13-Motilin besitzt nach der Reinigung praktisch die gleiche Aktivität wie natürlich vorkommendes Motilin, was als Indiz dafür anzusehen ist, dass der Sequenzplatz des Methionins auch von Norleucin eingenommen werden kann. Dieser Befund war insofern überraschend, als der Ersatz von Methionin durch Norleucin in natürlich vorkommendem Human-Gastrin I zu einem Syntheseprodukt führt, das nur etwa 10% Gastrin-Aktivität besitzt.

Gemäss vorliegender Erfindung wird eine weitere Verbesserung dadurch erzielt, dass ein gleich vorteilhaftes Motilinderivat wie nach dem Hauptpatent zur Verfügung gestellt wird, das jedoch billiger herstellbar und biologisch leichter abbaubar ist.

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von L-Leucin-13-Motilin gemäss Hauptpatent Nr. 602 598, dadurch gekennzeichnet, dass man ein im Hauptpatent definiertes Peptid erzeugt, worin in 13-Stellung ein Leucin statt Norleucin verwendet wird. Das L-Leucin-13-Motilin hat die Kurzformel

H-Phe-Val-Pro-Ile-Phe-Thr-Tyr-Gly-Glu-Leu-Gln-Arg-  
(1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12)

Leu-Glu-Glu-Lys-Glu-Arg-Asn-Lys-Gly-Gln-OH  
(13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22)

worin die in Klammern angegebenen Zahlen die von 1 bis 22 durchnummerierte Stellung der Aminosäurereste (ausser Glycin alle Aminosäuren in L-Konfiguration) in der Peptidkette angeben und worin die Bezeichnung der Aminosäurereste in üblicher bekannter Weise abgekürzt ist.

Das Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, dass man die Teilsequenzen

Fragment I, bestehend aus Arginyl-(hydrobromid)-asparagyl-Ne-tert.-butyloxy-carbonyl-lysyl-glycyl-glutamin-tert.-butylester (Aminosäuren 18–22),

Fragment II, bestehend aus N $\alpha$ -Benzyloxycarbonyl-glutamyl-( $\gamma$ -tert.-butylester)-glutamyl ( $\gamma$ -tert.-Butylester)-Ne-tert.-butyloxycarbonyl-lysyl-glutaminsäure- $\gamma$ -tert.-butylester (Aminosäuren 14–17),

Fragment III, bestehend aus N $\alpha$ -Benzyloxycarbonyl-N $\delta$ ,N $\omega$ -di-benzyloxycarbonyl-arginyl-leucin (Aminosäuren 12–13),

Fragment IV, bestehend aus N $\alpha$ -Benzyloxycarbonyl-Glutamyl-( $\gamma$ -tert.-butylester)-leucyl-glutamin (Aminosäuren 9–11),

Fragment V, bestehend aus O-tert.-Butyl-threonyl-O-tert.-butyltyrosyl-glycin (Aminosäuren 6–8) und

Fragment VI, bestehend aus N $\alpha$ -tert.-butyloxycarbonyl-phenylalanyl-valyl-propyl-isoleucyl-phenylalanin (Aminosäuren 1–5),

in denen alle Seitenkettenfunktionen der polyfunktionellen Aminosäuren leicht abspaltbare Gruppen tragen und die komplexen Funktionen des Argins entweder durch N $\delta$ , $\omega$ -Diacylierung oder durch eine durch Salzbildung mit Bromwasserstoff bewirkte Protonierung maskiert ist, kondensiert, die Schutzgruppen abspaltet und das rohe L-Leucin-13-Motilin isoliert.

Die Reinigung des erhaltenen L-Leucin-13-Motilins erfolgt analog dem Verfahren des Hauptpatentes vorteilhaft säulenchromatographisch an einem stark basischen Anionenaustauscherharz und danach an einem stark sauren Kationenaustauscherharz.

Die Anwendung dieses Mittels erfolgt in der Regel in solchen Dosierungen, dass pro kg Körpergewicht etwa 0,05–0,5  $\gamma$ , entsprechend 50–500 ng Motilinderivat, entfallen. Als Trägermittel dient vorwiegend physiologische Kochsalzlösung. Die Applikation ist intravenös, intramuskulär oder subkutan. So kann z. B. lyophilisiertes Motilinderivat je nach beabsichtigter Applikation in Mengen von 1–100  $\gamma$ /ml physiologische Kochsalzlösung, die z. B. durch Mannit stabilisiert werden kann, gelöst werden. Zur intravenösen Verabreichung an einen etwa 80 kg schweren Menschen ergeben 2 ml Injektionslösung, die 8  $\gamma$  Motilinderivat enthalten, eine Dosierung von 0,1  $\gamma$ /kg Körpergewicht. Zur Infusion an einen Menschen des angegebenen Gewichts können 8  $\gamma$  Motilinderivat in 30 ml physiologischer Kochsalzlösung gelöst und 0,5 ml dieser Lösung pro Minute appliziert werden, was etwa 0,1  $\gamma$  Motilinderivat/kg Körpergewicht/Std. entspricht. Im Tierversuch erwiesen sich vergleichbare Dosierungen als geeignet, und so wurde z. B. natürlich vorkommendes Motilin in Mengen von 0,05  $\gamma$ /kg Körpergewicht intravenös an Hunde verabreicht, wodurch ein kräftiger motorischer Aktivitätsanstieg bewirkt wurde (vgl. z. B. die angegebene Druckschrift «Can. J. Biochem.», 51 [1973], 533, linke Spalte, Absatz 1).

Zur Herstellung des Leucin-13-Motilins konnte der für das Norleucin-13-Motilin entworfene Syntheseplan herangezogen werden. Die Synthese der Fragmente I, II, IV, V und VI erfolgte daher nach dem im Hauptpatent beschriebenen Verfahren, ebenso wie die Kondensation der Fragmente I und II zur Teilsequenz (14–22b) sowie der Fragmente V und VI zur Teilsequenz (1–8).

Das Fragment III (Aminosäuren 12–13) mit C-endständigem Leucin wurde synthetisiert und mit der kondensierten Peptidfraktion I–II (14–22b) umgesetzt zur kondensierten Peptidfraktion I–II–III (12–22a), woraus nach hydrogenolytischer Abspaltung der Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe das entsprechende Undecapeptid (12–22b) in Form des Hydrobromids isoliert wurde. Die weitere Umsetzung mit Fragment IV (9–11) lieferte die kondensierte Peptidfraktion I–II–III–IV (9–22a), welche durch katalytische Hydrogenolyse in Gegenwart von Bromwasserstoffsäure zum Hydrobromid des Tetradecapeptids (9–22b) entacyliert und schliesslich kondensiert wurde mit der kondensierten Peptidfraktion V–VI (1–8) zum vollkommen geschützten Verfahrensprodukt I–II–III–IV–V–VI (1–22a), aus dem schliesslich nach Entfernung der Schutzgruppen mittels Trifluoressigsäure und nachfolgender Ionenaustauscherbehandlung und Lyophilisation das gewünschte Leucin-13-Motilin (1–22b) als Rohprodukt erhalten wurde.

Die Erfindung wird durch die beigefügte Zeichnung näher erläutert, in der darstellen:

Fig. 1 das Syntheschema zur Herstellung des Fragments I, Fig. 2 das Syntheschema zur Herstellung des Fragments II, Fig. 3 das Syntheschema zur Herstellung des Fragments VI, Fig. 4 das Syntheschema zur Herstellung des Fragments III sowie zur Verknüpfung der Fragmente I + II + III und

Fig. 5 das Syntheschema zur Herstellung des Fragments IV sowie zur Verknüpfung der Fragmente IV mit (I–III), VI mit V und (I–IV) mit (V–VI).

Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern. In den Figuren und Beispielen werden die folgenden, in der Peptidchemie üblichen Abkürzungen und Symbole verwendet:

Aminosäureabkürzungen, gebildet aus 3 Buchstaben, bei denen es sich in der Regel um die 3 Anfangsbuchstaben handelt,

Zahlenangaben in Klammern, die die Stellung innerhalb der Polypeptidkette wiedergeben, und die keinen weiteren Zusatz erhalten, wenn die betreffende Verbindung kein weiteres Derivat bildet, die jedoch fortlaufend mit dem Zusatz a, b, c usw. versehen werden, wenn von a ausgehend weitere Derivate hergestellt werden,

L	als Angabe der Konfiguration,
Z	für den Benzyloxycarbonylrest (vgl. z. B. Bergmann et al. in «Berichte d. Dtsch. Chem. Ges.» Bd. 65, 1932, 1192 ff.),
BOC	für den tert.-Butyloxycarbonylrest (vgl. z. B. McKay et al. in «J. Am. Chem. Soc.» Bd. 79, 1957, S. 4686 und Anderson et al. in «J. Am. Chem. Soc.» Bd. 79, 1957, S. 6180),
DCCD	für das N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid-Verfahren (vgl. z. B. Sheehan et al. in «J. Am. Chem. Soc.» Bd. 77, 1955, S. 1067),
DCCD/HOSU	für das N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid-N-Hydroxysuccinimid-Verfahren (vgl. z. B. Wunsch et al. in «Berichte d. Deutschen Chem. Ges.» Bd. 99, 1966, S. 110 und Weygand et al. in «Zeitschr. f. Naturforsch.» Bd. 216, 1966, S. 426 sowie König et al. in «Berichte d. Dtsch. Chem. Ges.» Bd. 103, 1970, S. 788),
DCCD/HOBt	für das N,N-Dicyclohexylcarbodiimid-N-Hydroxybenzotriazol-Verfahren (vgl. z. B. König et al. in «Ber. d. Dtsch. Chem. Ges.» Bd. 103, 1970, S. 788),
PAM	für die Phosphorazo-Methode (vgl. z. B. Goldschmidt in «Angew. Chem.» Bd. 62, 1950, S. 538 und Goldschmidt et al. in «Liebigs Ann.» Bd. 580, 1953, S. 68),
SU	für den N-Hydroxysuccinimidrest,
NP	für den p-Nitrophenylrest,
tBu	für den tert.-Butylrest,
DBSI	für Dibenzolsulfimid als Salzbildner,
Me	für den Methylrest,
TFE	für Trifluoressigsäure,
i.V.	für «im Vakuum»,
Ausb.	für Ausbeute,
d.Th.	(nach Ausbeuteangaben in %) für «der Theorie»,
F	für «Fließpunkt» und
(Z)	(nach der Fließpunktangabe) für «unter Zersetzung».

Im folgenden wird zunächst die Herstellung der für die Synthese verwendeten Fragmente beschrieben.

Herstellung des Fragments I (Teilsequenz 18–22)

Gemäss Hauptpatent wurde H-Gln-OtBu (22b), das aus Z-Gln-OH (22a) durch Veresterung mit Essigsäure-tert.-butylester unter Schwefelsäure-Katalyse und nachfolgender hydrogenolytischer Entfernung der Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe hergestellt worden war, mit Z-Gly-OSU (21) zum Benzyloxycarbonyl-Dipeptidester (21–22a) verknüpft; die nach hydrogenolytischer Entfernung der N-Schutzgruppe erhaltene Verbindung H-Gly-Gln-OtBu (21–22b) wurde mit

Z-Asn-Lys(BOC)-OH (19–20) nach dem von Wunsch und Weygand in den genannten Literaturstellen beschriebenen N,N'-Carbodiimid-N-Hydroxysuccinimid-Verfahren oder nach dessen von König et al. in der angegebenen Literaturstelle beschriebenen Modifikationen zum Benzyloxycarbonyl-tetrapeptid-tert.-butylester (19–22a) verknüpft. Die verwendete Kopfkomponente (19–20) wurde durch Aminoacylierung von H-Lys(BOC)-OH (20) mit Z-Asn-ONP (19) unter üblichen bekannten Bedingungen gewonnen.

Aus Z-Asn-Lys(BOC)-Gly-Gln-OtBu (19–22a) wurde die Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe durch katalytische Hydrierung entfernt unter Bildung des Tetrapeptid-Ester-Derivats (19–22b), das mit Z-Arg( $\delta,\omega$ -Z<sub>2</sub>)-ONP (18) zum Z-Arg( $\delta,\omega$ -Z<sub>2</sub>)-Asn-Lys(BOC)-Gly-Gln-OtBu (18–22a) vereinigt wurde.

Die experimentelle Durchführung war wie folgt:

A. L-Glutamin-tert.-butylester-dibenzolsulfimid-salz  
103 g Benzyloxycarbonyl-glutamin-tert.-butylester (erhalten nach dem von Schnabel et al. in «Liebigs Ann.», Bd. 686, 1965, S. 229 beschriebenen Verfahren) in 2 l Methanol wurden unter Zutropfen von 91 g Dibenzolsulfimid in 500 ml Methanol bei pH = 3,5 in üblicher bekannter Weise katalytisch (Palladiumschwarz) hydriert.

Das Filtrat wurde i. V. eingedampft, zum Schluss unter azeotroper Destillation mit Benzol; aus der Essigesterlösung des öligen Rückstandes trat beim Versetzen mit Diäthyläther Kristallisation ein. Aus Methanol/Diäthyläther resultierten Kristalle von F = 135–136°;  $[\alpha]_D^{20} = +10,78^\circ$  (c = 1,0; in Methanol). Ausb. = 146 g (97% d. Th.).

B. Benzyloxycarbonyl-glycyl-L-glutamin-tert.-butylester  
115 g L-Glutamin-tert.-butylester-dibenzolsulfimid-salz suspendiert in 800 ml Dichlormethan wurden mit 32,2 ml Triäthylamin und danach mit 70,5 g Benzyloxycarbonyl-glycyl-N-hydroxysuccinimidester unter Rühren versetzt. 24 Std. Rühren bei Raumtemperatur, Einengen i. V., Aufnehmen des Öls in Essigester, Waschen dieser Lösung wie üblich mit Zitronensäure-, Kaliumhydrogencarbonatlösung und Wasser, Trocknen über Natriumsulfat und Eindampfen i. V. führten zu einem Öl. Ausb. = 87 g (93% d. Th.).

C. Glycyl-L-glutamin-tert.-butylester-dibenzolsulfimid-salz  
80 g Benzyloxycarbonyl-glycyl-L-glutamin-tert.-butylester (gem. B.) in 900 ml Methanol wurden, wie unter A beschrieben, hydrogenolytisch entacyliert (60 g Dibenzolsulfimid) und aufgearbeitet. Es resultierte ein öliger Rückstand, der beim Verreiben mit Petroläther kristallisierte; F = 92° (Z);  $[\alpha]_D^{20} = -8,5^\circ$  (c = 1,0; in Methanol). Ausb. = 110 g (98% d. Th.).

D. Benzyloxycarbonyl-L-asparaginyln<sub>ε</sub>-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysin

51 g n<sub>ε</sub>-tert.-Butyloxycarbonyl-L-lysin wurden in üblicher bekannter Weise in das Benzyltriäthylammoniumsalz übergeführt und danach in 700 ml Dimethylformamid mit 81 g Benzyloxycarbonyl-L-asparagin-4-nitrophenylester unter Zugabe von 1 Äquiv. Pyridin 48 Std. lang bei 20° gerührt. Der Vakuumverdampfungsrückstand wurde mit Essigester und Kaliumhydrogensulfatlösung gleichzeitig behandelt; der gebildete dicke Niederschlag wurde abfiltriert und dann aus Äthanol/Petroläther umkristallisiert. F = 174–175° (Z);  $[\alpha]_D^{20} = +13,8^\circ$  (c = 1,0; in Pyridin). Ausb. = 70 g (71% d. Th.).

E. Benzyloxycarbonyl-L-asparaginyln<sub>ε</sub>-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-glycyl-L-glutamin-tert.-butylester  
61,5 g Glycyl-L-glutamin-tert.-butylester-dibenzolsulfimid-salz und 54,5 g Benzyloxycarbonyl-L-asparaginyln<sub>ε</sub>-tert.-

butyloxycarbonyl-L-lysin in 700 ml Dimethylformamid wurden unter Rühren bei 0° C zunächst mit 15,5 ml Triäthylamin und nach 15 Min. mit 13 g N-Hydroxysuccinimid sowie 23 g N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid versetzt. Nach 3 Std. wurde weitere 24 Std. bei Raumtemperatur gerührt. Das Filtrat wurde weitere 5  
 24 Std. bei Raumtemperatur gerührt. Das Filtrat wurde weitere 24 Std. bei Raumtemperatur gerührt. Das Filtrat wurde weitere 24 Std. bei Raumtemperatur gerührt. Der Rückstand kristallisierte beim Behandeln mit Essigester. Umkristallisiert wurde aus Methanol/Wasser und Isopropanol/Essigester. F = 155–156°;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -20,8^\circ$  (c = 1,0; in Äthanol). Ausb. = 63 g (78% d. Th.).

F. L-Asparaginyln-*N* $\epsilon$ -tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-glycyl-L-glutamin-tert.-butylester-hydrochlorid

47,5 g Benzyloxycarbonyl-L-asparaginyln-*N* $\epsilon$ -tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-glycyl-L-glutamin-tert.-butylester (gem. E) in 800 ml Methanol wurden unter Konstanthaltung des pH-Werts wie üblich hydriert (pH = 5,5; 25,2 ml 2,5 N-Chlorwasserstofflösung in Methanol). Das i. V. eingedampfte Filtrat ergab ein Öl; farbloses Pulver entstand nach Verreiben mit Diäthyläther. F = 98°,  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +9,5^\circ$  (c = 1,0 in Methanol). Ausb. = 40 g (97% d. Th.).

G. *N* $\alpha$ ,*N* $\delta$ ,*N* $\omega$ -Tris-benzyloxycarbonyl-L-arginyl-L-asparaginyln-*N* $\epsilon$ -tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-glycyl-L-glutamin-tert.-butylester

31,9 g L-Asparaginyln-*N* $\epsilon$ -tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-glycyl-L-glutamin-tert.-butylester-hydrochlorid (gem. F) und 33,68 g *N* $\alpha$ ,*N* $\delta$ ,*N* $\omega$ -Tris-benzyloxycarbonyl-L-arginin-N-hydroxysuccinimidester in 1 l Dimethylformamid wurden bei 0° C mit 7 ml Triäthylamin versetzt; nach 24stündigem Rühren bei Raumtemperatur, Eindampfen i. V., Umfällen des Rückstandes aus Methanol/Wasser und danach Umkristallisieren aus Methanol resultierte ein farbloses Pulver;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -7,6^\circ$  (c = 1,0; in Eisessig). Ausb. = 46,5 g (80% d. Th.).

H. L-Arginyl(hydrobromid)-L-asparaginyln-*N* $\epsilon$ -tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-glycyl-L-glutamin-tert.-butylester-hydrobromid-dihydrat

45,5 g *N* $\alpha$ ,*N* $\delta$ ,*N* $\omega$ -Tris-benzyloxycarbonyl-L-arginyl-L-asparaginyln-*N* $\epsilon$ -tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-glycyl-L-glutamin-tert.-butylester (gem. G) in 1,5 l Dimethylformamid/Methanol (2 : 1) wurden unter Konstanthaltung des pH-Werts in üblicher bekannter Weise hydrogenolytisch entacyliert (pH = 1,5; 80 ml 1 N-Bromwasserstoffsäure). Eindampfen des Filtrats i. V. und Umfällen des Rückstandes aus Äthanol/Diäthyläther führte zu einem amorphen Pulver:  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -4,8^\circ$  (c = 1,0; in 80%iger Essigsäure). Ausb. = 37 g (98% d. Th.).

Ausbeute 55% über alle Stufen, bezogen auf H-Gln-OtBu (22b) als Startmaterial;

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -7,6 \pm 1^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{\text{S46}}^{20} = -9,4^\circ$  (c = 1; in Essigsäure);

chromatographisch rein in n-Butanol/Eisessig/Wasser 3 : 1 : 1 und n-Heptan/tert.-Butanol/Eisessig 5 : 1 : 1;

Analyse:

ber.: C 57,98 H 6,69 N 13,29 O 22,02  
 gef.: C 57,70 H 6,56 N 13,29 O 22,45

Durch nachfolgende Entfernung der drei Benzyloxy-carbonyl-Maskierungen durch katalytische Hydrogenolyse unter Zusatz von zwei Äquivalenten Bromwasserstoff wurde das gewünschte Fragment I, nämlich H-Arg(HBr)-Asn-Lys(BOC)-Gly-Gln-OtBu-HBr (18–22b), erhalten.

Ausbeute: 98%;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -4,8 \pm 1^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{\text{S46}}^{20} = -6,05^\circ$  (c = 1; in 80%iger Essigsäure);

chromatographisch rein in n-Butanol/Eisessig/Wasser 3 : 1 : 1 und tert.-Amylalkohol/Pyridin/Wasser 35 : 35 : 30;

Analyse:

ber.: C 40,21 H 6,85 N 16,12 Br 16,72  
 gef.: C 40,46 H 6,93 N 15,89 Br 16,51

Herstellung des Fragments II (Teilsequenz 14–17)

Gemäss Hauptpatent wurden Z-Lys(BOC)-OSU (16) und H-Glu(OtBu)-OMe (17) ohne Schwierigkeiten zum Benzyloxycarbonyl-dipeptidester (16–17a) vereinigt. Die nachfolgende alkalische Esterverseifung und anschliessende katalytische Entacylierung führte über das Dipeptid-Derivat (16–17b) zu H-Lys(BOC)-Glu(OtBu)-OH (16–17c). Diese Verbindung wurde zweimal nacheinander mit Z-Glu(OtBu)-OSU (15 bzw. 14) umgesetzt, wobei jeweils das Glutaminsäurederivat als Kopfkomponente verwendet wurde. Auf diese Weise wurde das Fragment II, nämlich Z-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Lys(BOC)-Glu(OtBu)-OH (14–17a) erhalten.

Die experimentelle Durchführung erfolgte in analoger Weise wie bei der Herstellung des Fragments I beschrieben.

Ausbeute: 48% über alle Stufen, bezogen auf H-Glu(OtBu)-OMe (17); F = 147–149°;

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -9,8 \pm 1^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{\text{S46}}^{20} = 12,3^\circ$  (c = 1; in Dimethylformamid);

chromatographisch rein in Cyclohexan/Chloroform/Eisessig 45 : 45 : 10;

Analyse:

ber.: C 59,02 H 7,86 N 7,48  
 gef.: C 58,70 H 8,04 N 7,72

25 Herstellung des Fragments III (Teilsequenz 12–13)

Zur Herstellung von *N* $\alpha$ ,*N* $\delta$ ,*N* $\omega$ -Tris-benzyloxycarbonyl-L-arginyl-L-leucin wurden 30 g Z-Arg( $\delta$ , $\omega$ -Z<sub>2</sub>)-OSU (12) und 11,6 g Leucin (13) in Dioxan/Wasser (1000 : 500 ml) nach Zugabe von 89 ml N-Natriumhydroxidlösung unter 18stündigem Rühren umgesetzt. Nach Zusatz von 89 ml N-Salzsäure wurde das Reaktionsgemisch in Essigsäureäthylester aufgenommen, die erhaltene Lösung mit verdünnter Salzsäure und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. V. entfernt. Der Rückstand wurde 35 aus Wasser/Äthanol und Essigsäureäthylester/Diäthyläther/Petroläther umgefällt.

Ausbeute: 26,6 g (86,6% d. Th.); F = 126–128°;

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -5,8 \pm 1^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{\text{S46}}^{20} = -7,1^\circ$  (c = 1; in Essigsäure);

40 chromatographisch rein in n-Heptan/tert.-Butanol/Essigsäure (5 : 1 : 1);

Analyse:

ber.: C 62,69 H 6,28 N 10,15  
 gef.: C 62,59 H 6,41 N 9,94

45 Aminosäureanalyse: Arg 1,00 Leu 1,00.

Herstellung des Fragments IV (Teilsequenz 9–11)

Gemäss Hauptpatent wurde das nach dem in «Berichte d. Dtsch. Chem. Ges.», Bd. 104, 1971, S. 2430 beschriebenen Verfahren synthetisierte Dipeptid H-Leu-Gln-OH als Sequenzteilstück (10–11) verwendet und mit Z-Glu(OtBu)-OSU (9) in 74%iger Ausbeute zum Fragment IV, nämlich Z-Glu(OtBu)-Leu-Gln-OH (9–11), umgesetzt.

Die experimentelle Durchführung erfolgte in analoger Weise wie bei der Herstellung des Fragments I beschrieben.

55 F = 146–148°;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -31,6 \pm 1^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{\text{S46}}^{20} = -38,1^\circ$  (c = 1; in Methanol);

chromatographisch rein in n-Heptan/tert.-Butanol/Eisessig 5 : 1 : 1 und n-Butanol/Eisessig/Wasser 3 : 1 : 1;

Analyse:

60 ber.: C 58,12 H 7,32 N 9,68  
 gef.: C 58,05 H 7,24 N 9,48

Herstellung des Fragments V (Teilsequenz 6–8)  
 (gemäss Hauptpatent)

65 Das nach dem in «Zeitschr. f. Physiol. Chem.», Bd. 353, 1972, Seite 1246 beschriebene Verfahren synthetisierte Dipeptid H-Tyr(tBu)-Gly-OH wurde als Sequenzteilstück (7–8) verwendet. Verknüpfung von H-Tyr(tBu)-Gly-OH (7–8) mit

Z-Thr(tBu)-OSU (6) lieferte das Benzyloxycarbonyl-tripeptid (6–8a), das durch katalytische Hydrogenolyse das gewünschte Fragment V, nämlich H-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Gly-OH (6–8b) ergab.

Die experimentelle Durchführung erfolgte in analoger Weise wie bei der Herstellung des Fragments I beschrieben.

Ausbeute: ca. 81 % über beide Stufen, bezogen auf eingesetztes Dipeptid (7–8); F = 126–127°;

$[\alpha]_D^{20} = +7,9 \pm 1^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20} = +8,9^\circ$  (c = 1; in Methanol);

chromatographisch rein in tert.-Amylalkohol/Pyridin/Wasser 35:35:30;

Analyse:

ber.: C 60,88 H 8,30 N 8,88

gef.: C 60,69 H 8,31 N 8,91

bezogen auf ein Dipeptid mit  $\frac{1}{4}$  Mol Kristall-Essigester.

#### Herstellung des Fragments VI (Teilsequenz 1–5) (gemäss Hauptpatent)

Nach dem angegebenen Carbodiimid-Verfahren wurde Z-Ile-OH (4) mit H-Phe-OtBu (5) verknüpft. Durch anschliessende katalytische Hydrogenolyse des intermediären Benzyloxycarbonyl-Dipeptid-Esters (4–5a) konnte H-Ile-Phe-OtBu (4–5b) in über 90%iger Ausbeute isoliert werden.

Gleichzeitig wurden BOC-Val-OH (2a) und H-Pro-OME (3a) nach der angegebenen Phosphorazo-Methode zum tert.-Butyloxycarbonyl-Dipeptid-Ester (2–3a) vereinigt; nachfolgende alkalische Esterverseifung ergab in über 70%iger Ausbeute BOC-Val-Pro-OH (2–3b). Einfacher und in höher Ausbeute (83%) verlief die Herstellung von (2–3b) durch Umsetzung von BOC-Val-OSU (2b) mit zwei Äquivalenten Prolin (3b).

Beide Dipeptid-Derivate liessen sich mit Hilfe der angegebenen Carbodiimid-Methode zum BOC-Val-Pro-Ile-Phe-OtBu, (2–5a) verknüpfen; Trifluoressigsäure-Einwirkung auf (2–5a) führte zum freien Tetrapeptid H-Val-Pro-Ile-Phe-OH (2–5b), an das in üblicher bekannter Weise BOC-Phe-OSU (1) zum BOC-Phe-Val-Pro-Ile-Phe-OH (1–5a) (Fragment VI) angebaut wurde.

Die experimentelle Durchführung erfolgte in analoger Weise wie bei der Herstellung des Fragments I beschrieben.

Ausbeute: 63 % über die letzten drei Stufen, bezogen auf (4–5b); F = 218°;

$[\alpha]_D^{20} = 64,2 \pm 1^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20} = -75,82^\circ$  (c = 1; in Essigsäure);

chromatographisch rein in n-Butanol/Eisessig/Wasser 3:1:1 und tert.-Amylalkohol/Pyridin/Wasser 35:35:30;

Analyse:

ber.: C 64,88 H 7,64 N 9,70

gef.: C 64,72 H 7,70 N 9,61

#### Beispiel 1

Kondensation der Fragmente I bis VI (Gesamtsequenz 1–22)

Mit dem carboxylendständigen Fragment I (18–22b) wurde mit Hilfe des angegebenen Dicyclohexylcarbodiimid-N-Hydroxysuccinimid-Verfahrens das Fragment II (14–17a) durch Kondensation vereinigt und der erhaltene N-Benzyloxycarbonyl-nonapeptid-tert.-butylester (14–22a) wurde durch katalytische Hydrogenolyse in H-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Lys(BOC)-Glu(OtBu)-Arg(HBr)-Asn-Lys(BOC)-Gly-Gln-OtBu (14–22b) überführt.

Die Vereinigung mit Fragment III wiederum mit Hilfe des genannten Verfahrens führte zur Bildung von Z-Arg( $\delta,\omega$ -Z<sub>2</sub>)-Leu-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Lys(BOC)-Glu(OtBu)-Arg(HBr)-Asn-Lys(BOC)-Gly-Gln-OtBu (12–22a).

Durch katalytische Hydrierung wurden aus dem Undecapeptid (12–22a) die drei Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppen entfernt und durch Neutralisation der freigewordenen Guanido-

Funktion mit Bromwasserstoffsäure während der Hydrierung resultierte H-Arg(HBr)-Leu-Glu(OtBu)-Blu(OtBu)-Lys(BOC)-Glu(OtBu)-Arg(HBr)-Asn-Lys(BOC)-Gly-Gln-OtBu (12–22b) in Form des Hydrobromids.

Der erhaltene Undecapeptidester wurde mit Fragment IV (9–11) nach dem angegebenen Dicyclohexylcarbodiimid-N-Hydroxybenzotriazol-Verfahren durch Kondensation vereinigt, und aus dem erhaltenen Tetradecapeptid-Derivat (9–22a) wurde nach hydrogenolytischer Abspaltung der Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe H-Glu(OtBu)-Leu-Gln-Arg(HBr)-Leu-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Lys(BOC)-Glu(OtBu)-Arg(HBr)-Asn-Lys(BOC)-Gly-Gln-OtBu (9–22b) erhalten.

Während des Ablaufs vorstehender Reaktionen wurden die Fragmente V (6–8a) und VI (1–5a), letzteres nach Überführung in den (N-Hydroxysuccinimid)-ester (1–5b), vereinigt. Es gelang jedoch nicht, BOC-Phe-Val-Pro-Ile-Phe-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Gly-OH (1–8) rein zu gewinnen, und die Aminosäureanalyse zeigte eine Verunreinigung mit etwa 10% (1–5a) oder (1–5b) an. Versuche zur Auftrennung dieses Gemisches verliefen ohne Erfolg.

Das erhaltene «rohe» Teilstück (1–8) wurde mit dem obigen Teilstück (9–22b) wiederum nach dem angegebenen Dicyclohexylcarbodiimid-N-Hydroxysuccinimid-Verfahren zum BOC-Phe-Val-Pro-Ile-Phe-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Gly-Glu(OtBu)-Leu-Gln-Arg(HBr)-Leu-Glu(OtBu)-Glu(OtBu); Lys(BOC)-Glu(OtBu)-Arg(HBr)-Asn-Lys(BOC)-Gly-Gln-OtBu (1–22a) verknüpft.

Nach Abspaltung aller Schutzgruppen mittels wasserfreier Trifluoressigsäure und anschliessendem Austausch der Trifluoracetat- und Bromidionen durch Ionenaustauschchromatographie an einem unter der Bezeichnung «Dowex 44» bekannten, schwach basischen Ionenaustauscherharz (Acetat-Form) wurde ein «Roh-Leucin-13-Motilin» (1–22b) erhalten, das aufgrund des Einsatzes von «unreinem» Teilstück (1–8) mit einer «Fehlsequenz» behaftet sein musste, was sich bei der Reinigungsoperation auch bestätigte.

Die experimentelle Durchführung der Fragmentkondensation war wie folgt:

#### A. Kondensation I mit II

Gemäss Hauptpatent wurden 9,2 g Fragment I (gem. Bsp. 1 H), 9,36 g Fragment II (gem. Bsp. 2) und 1,4 ml Triäthylamin in 200 ml Dimethylformamid bei 0° C mit 2,3 g N-Hydroxysuccinimid und anschliessend mit 3,1 g N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid versetzt; die Reaktionsmischung wurde 24 Std. lang bei 5° C und 4 Tage lang bei Raumtemperatur gerührt, worauf das Filtrat i. V. eingedampft wurde. Der Rückstand wurde mehrmals mit Wasser digeriert und schliesslich zweimal aus Methanol/Essigester umgefällt.

Es resultierte Benzyloxycarbonyl-L-glutamyl( $\gamma$ -tert.-butylester)-L-glutamyl( $\gamma$ -tert.-butylester)-N $\epsilon$ -tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-glutamyl( $\gamma$ -tert.-butylester)-L-arginyl(hydrobromid)-L-asparaginyll-N $\epsilon$ -tert.-butyloxycarbonyl-L-lysylglycyl-glutamin-tert.-butylester in Form eines amorphen Pulvers.

$[\alpha]_D^{20} = -14,6^\circ$  (c = 1; in Dimethylformamid).

Ausb. 14,8 g (84% d. Th.).

12,3 g der erhaltenen Verbindung in 800 ml Methanol wurden unter Konstanthaltung des pH-Werts in üblicher bekannter Weise katalytisch hydriert (pH = 5,5; 7 ml 1 N-Bromwasserstoffsäure). Das Filtrat wurde i. V. eingedampft, der Rückstand aus Äthanol/Essigester zweimal umgefällt.

Es resultierte L-Glutamyl( $\gamma$ -tert.-butylester)-L-glutamyl( $\gamma$ -tert.-butylester)-N $\epsilon$ -tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-glutamyl( $\gamma$ -tert.-butylester)-L-arginyl(hydrobromid)-L-asparaginyll-N $\epsilon$ -tert.-butyloxycarbonyl-L-lysylglycyl-glutamin-tert.-butylester-hydrobromid als das gewünschte Kondensationsprodukt (14–22b).

$[\alpha]_D^{20} = -21,5^\circ$  ( $c = 1,0$ ; in Methanol).  
Ausb. 11,4 g (96% d. Th.).

#### B. Kondensation (I–II) mit III

Eine Lösung von 1,7 g Peptid (14–22b), 1,4 g Z-Arg-( $\delta,\omega$ -Z<sub>2</sub>)-Leu-OH (12–13), 0,3 g N-Hydroxysuccinimid und 0,14 ml Triäthylamin in 100 ml Dimethylformamid wurde bei  $-10^\circ$  mit 0,412 g N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid versetzt und 24 Std. lang bei  $4^\circ$  gerührt. Nach weiterem 24stündigem Rühren bei Raumtemperatur wurde vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff abfiltriert, das Lösungsmittel i. V. entfernt und der Eindampfrückstand aus Methanol/Essigsäureäthylester umgefällt. Das erhaltene Produkt wurde sorgfältig mit Wasser digeriert, abfiltriert und getrocknet.

Es resultierte N $\alpha$ ,N $\delta$ ,N $\omega$ -Tris-benzyloxycarbonyl-L-arginyl-L-leucyl-L-glutamyl( $\gamma$ -tert.-butylester)-L-glutamyl( $\gamma$ -tert.-butylester)-N $\epsilon$ -tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-glutamyl( $\gamma$ -tert.-butylester)-L-arginyl(hydrobromid)-L-asparaginyln-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-glycyl-L-glutamin-tert.-butylester (12–22a).

Ausb. 1,94 g (85% d. Th.); chromatographisch rein in n-Heptan/tert.-Butanol/Essigsäure (3:2:1) und n-Butanol/Essigsäure/Wasser (3:1:1).

Aminosäureanalyse:

Lys 2,02, Arg 2,01, Asp 1,00, Glu 3,98, Gly 1,01, Leu 1,00.

1,8 g Peptid in 500 ml Methanol wurden unter Zutropfen von 15,70 ml 0,1 N-Bromwasserstoffsäure bei pH 4,5 durch katalytische Hydrierung entacyliert. Das vom Katalysator befreite Filtrat wurde i. V. eingedampft, und der erhaltene Rückstand wurde aus Methanol/Essigsäureäthylester umgefällt.

Es resultierte L-Arginyl(hydrobromid)-L-leucyl-L-glutamyl( $\gamma$ -tert.-butylester)-L-glutamyl( $\gamma$ -tert.-butylester)-N $\epsilon$ -tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-glutamyl( $\gamma$ -tert.-butylester)-L-arginyl(hydrobromid)-L-asparaginyln-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-glycyl-L-glutamin-tert.-butylester-hydrobromid-dihydrat (12–22b).

Ausb. 1,61 g (98% d. Th.).

Analyse:

ber.:	C 47,12	H 7,43	N 14,07
gef.:	C 47,20	H 7,50	N 14,00

#### C. Kondensation (I–II–III) mit IV

1,56 g Peptid (12–22b) und 0,87 g Peptid (9–11) in 100 ml Dimethylformamid wurden nach Zusatz von 0,105 ml Triäthylamin mit 0,210 g N-Hydroxybenzotriazol und 0,320 g Dicyclohexylcarbodiimid wie unter (B) beschrieben kondensiert.

Es resultierte N-Benzoyloxycarbonyl-L-glutamyl( $\gamma$ -tert.-butylester)-L-leucyl-L-glutamyl-L-arginyl(hydrobromid)-L-leucyl-L-glutamyl( $\gamma$ -tert.-butylester)-L-glutamyl( $\gamma$ -tert.-butylester)-N $\epsilon$ -tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-glutamyl( $\gamma$ -tert.-butylester)-L-arginyl(hydrobromid)-L-asparaginyln-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-glycyl-L-glutamin-tert.-butylester-dihydrat (9–22a).

Ausb. 1,6 g (83% d. Th.).

Analyse:

ber.:	C 51,41	H 7,57	N 13,63	Br 6,22
gef.:	C 51,28	H 7,55	N 13,57	Br 6,15

1,6 g Peptid (9–22a) in 600 ml Methanol wurden unter Konstanthaltung des pH-Werts, wie unter (B) beschrieben, durch katalytische Hydrierung entacyliert. Das vom Katalysator befreite Filtrat wurde i. V. eingedampft, und der Rückstand wurde aus Methanol/Essigsäureäthylester umgefällt.

Es resultierte L-Glutamyl( $\gamma$ -tert.-butylester)-L-leucyl-L-glutamyl-L-arginyl(hydrobromid)-L-leucyl-L-glutamyl( $\gamma$ -tert.-butylester)-L-glutamyl( $\gamma$ -tert.-butylester)-N $\epsilon$ -tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-glutamyl( $\gamma$ -tert.-butylester)-L-arginyl(hydrobromid)-L-asparaginyln-tert.-butyloxy-

carbonyl-L-lysyl-glycyl-L-glutamin-tert.-butylester-hydrobromid-Tetrahydrat (9–22b).

Ausb. 1,5 g (96% d. Th.);

$[\alpha]_D^{20} = -5,3 \pm 1$  und  $[\alpha]_{546}^{20} = -7,2^\circ$  ( $c = 0,7$ ; in Methanol);

chromatographisch rein in n-Butanol/Essigsäure/Wasser (3:1:1).

Aminosäureanalyse:

Lys 2,04, Arg 2,01, Asp 0,98, Glu 6,05, Gly 1,01, Leu 2,00.

#### D. Kondensation V mit VI

Gemäss Hauptpatent wurden 21,6 g Fragment VI und 6,9 g N-Hydroxysuccinimid in 400 ml Dimethylformamid bei  $-5^\circ$  C mit 6,3 g N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 2 Std. lang bei  $0^\circ$  C und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Filtration wurde das Filtrat i. V. eingedampft; der ölige Rückstand kristallisierte aus Isopropanol.

Es resultierte tert.-Butyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-valyl-L-prolyl-L-isoleucyl-L-phenylalanin-N-hydroxysuccinimidester.

Ausb. 21,3 g (88% d. Th.);

$F = 190-192^\circ$ ;  $[\alpha]_D^{20} = +59,28^\circ$  ( $c = 1,0$ ; in Dioxan).

12,2 g Fragment V und 3,8 ml Triäthylamin in 400 ml Dimethylformamid wurden mit 14,8 g des obigen, aus Fragment VI gewonnenen Succinimidesters versetzt; das Reaktionsgemisch wurde nach 24stündigem Rühren bei Raumtemperatur i. V. eingedampft, und der ölige Rückstand wurde zwischen Essigester und Zitronensäurelösung verteilt. Die Essigesterphase wurde in üblicher bekannter Weise gewaschen, getrocknet und i. V. zur Trockene gebracht. Aus Essigester/Petroläther wurden farblose Kriställchen aus tert.-Butyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-valyl-L-prolyl-L-isoleucyl-L-phenylalanyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-O-tert.-butyl-L-tyrosyl-glycin (1–8) erhalten.

Ausb. 18,2 g (87% d. Th.);

$[\alpha]_D^{20} = -44,0^\circ$  ( $c = 1,0$ ; in Äthanol).

#### E. Kondensation (I–II–III–IV) mit (V–VI)

1,28 g Peptid (9–22b) gemäss (C), 1,17 g Peptid (1–8) gemäss (D), 0,07 ml Triäthylamin und 0,115 g N-Hydroxysuccinimid (bzw. in weiteren Versuchen 0,20 g N-Hydroxybenzotriazol) in 100 ml Dimethylformamid wurden bei  $-10^\circ$  mit 0,206 g N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 2 Tage lang bei  $0^\circ$  C und 3 Tage lang bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels i. V. wurde der Rückstand sorgfältig mit heissem Essigester digeriert, das harzartige Produkt aus Methanol/Essigester umgefällt, nach Verreiben mit Essigester getrocknet und danach 5 Std. lang erschöpfend mit Wasser behandelt. Es wurde aus Methanol/Wasser umgefällt.

Es resultierte N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-valyl-L-prolyl-L-isoleucyl-L-phenylalanyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-O-tert.-butyl-L-tyrosyl-glycyl-L-glutamyl( $\gamma$ -tert.-butylester)-L-leucyl-L-glutamyl-L-arginyl(hydrobromid)-L-leucyl-L-glutamyl( $\gamma$ -tert.-butylester)-L-glutamyl( $\gamma$ -tert.-butylester)-N $\epsilon$ -tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-glutamyl( $\gamma$ -tert.-butylester)-L-arginyl(hydrobromid)-L-asparaginyln-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-glycyl-L-glutamin-tert.-butylester-hexahydrat (1–22a).

Ausb. 1,65 g (91% d. Th.).

Analyse:

ber.:	C 54,03	H 7,82	N 12,68	Br 4,38
gef.:	C 54,13	H 7,80	N 12,67	Br 4,6

1 g geschütztes Peptid (1–22a) gemäss (E) wurde mit 40 ml eiskalter Trifluoressigsäure übergossen und 2 Std. lang bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach wurde überschüssige Trifluoressigsäure i. V. bei möglichst tiefer Tempe-

ratur entfernt, das verbleibende Material in verdünnter Essigsäure aufgenommen, die erhaltene Lösung zweimal mit 4 g eines schwach basischen Anionenaustauschers in der Acetat-Form (z. B. «Dowex 44») behandelt, worauf das Austauscher-Eluat lyophilisiert wurde.

Es resultierte L-Phenylalanyl-L-valyl-L-prolyl-L-isoleucyl-L-phenylalanyl-L-threonyl-L-tyrosyl-glycyl-L-glutamyl-L-leucyl-L-glutamyl-L-arginyl-L-leucyl-L-glutamyl-L-glutamyl-L-lysyl-L-glutamyl-L-arginyl-L-asparaginyll-L-lysyl-glycyl-L-glutamin.

Ausb. 0,74 g.

#### Beispiel 2

##### Reindarstellung und Aminosäureanalyse

Gemäss Hauptpatent erfolgte die Reinigung in Anlehnung an die Reindarstellung von natürlichem Motilin durch Ionenaustausch-Chromatographie mit Hilfe eines stark basischen Anionenaustauscherharzes, z. B. des in der Acetatform vorliegenden, unter der Bezeichnung «QAE-Sephadex A-25» bekannten Harzes auf der Basis eines modifizierten Dextrans mit Diäthyl-(2-hydroxypropyl)-aminoäthylresten als funktionelle Gruppen, und danach mit Hilfe eines stark sauren Kationenaustauscherharzes, z. B. des in der Ammoniumform vorliegenden, unter der Bezeichnung «SP-Sephadex C-25» bekannten Harzes auf der Basis eines modifizierten Dextrans mit Sulfopropylresten als funktionellen Gruppen.

Eine Aminosäureanalyse wurde nach saurer Hydrolyse (6N-HCl) durchgeführt, wobei sich zeigte, dass praktisch dieselben Werte bei 20 und bei 72 Std. Hydrolysezeit erzielt wurden. Die erhaltenen Ergebnisse sind in der folgenden

5 Tabelle aufgeführt:

Tabelle			
	gefunden	berechnet	
10	Lys	2,00	2
	Arg	1,93	2
	Asp	1,00	1
	Thr	0,97	1
	Glu	6,18	6
15	Pro	0,98	1
	Gly	1,99	2
	Val	0,90	1
	Ile	0,90	1
	Leu	1,94	2
20	Tyr	0,93	1
	Phe	1,82	2

Die biologische Aktivität des gefriergetrockneten L-Leucin-13-Motilins war praktisch gleich derjenigen des L-Norleucin-25 13-Motilins und unterschied sich somit kaum von derjenigen des natürlichen Motilins.



Fig. 1

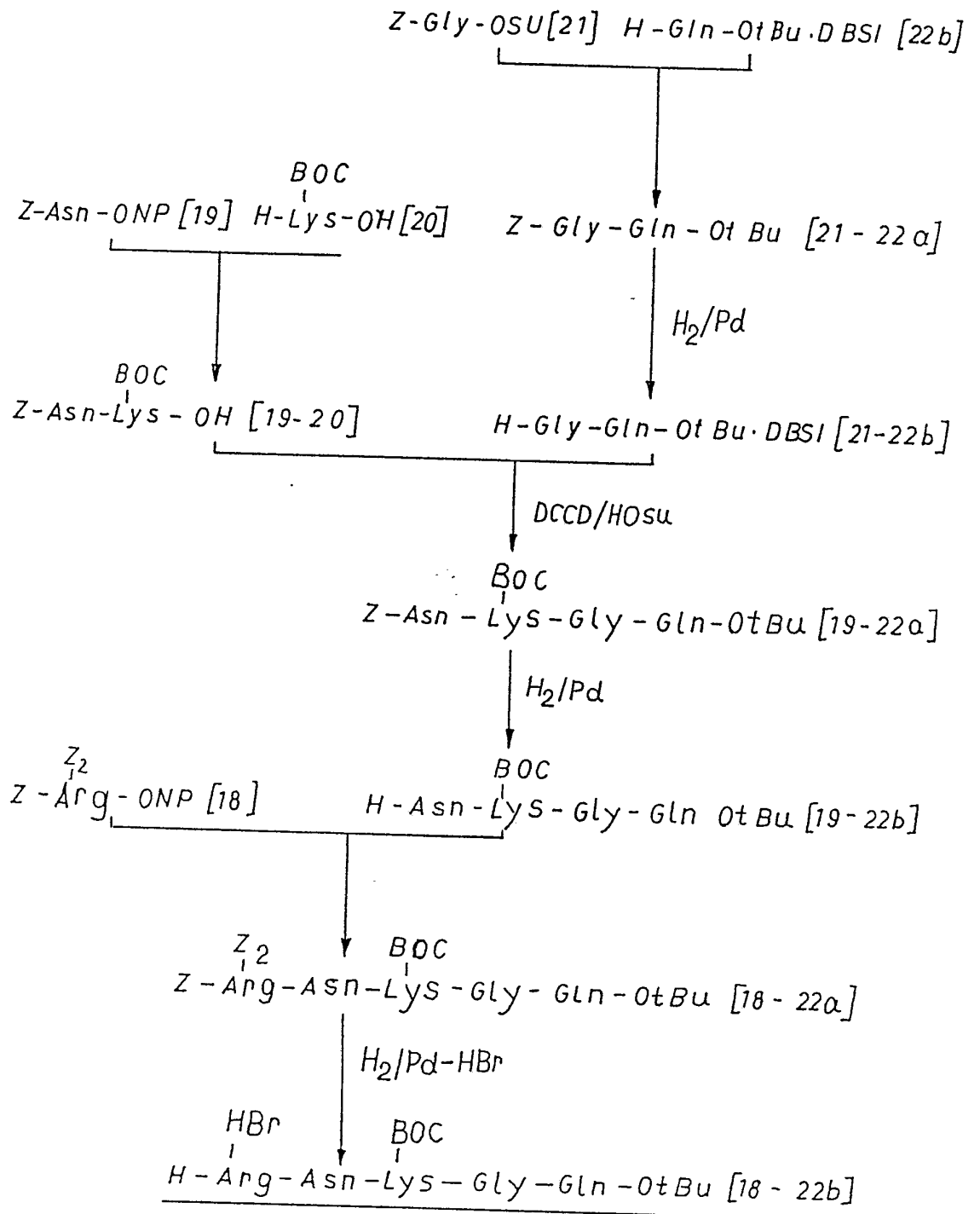


Fig. 2

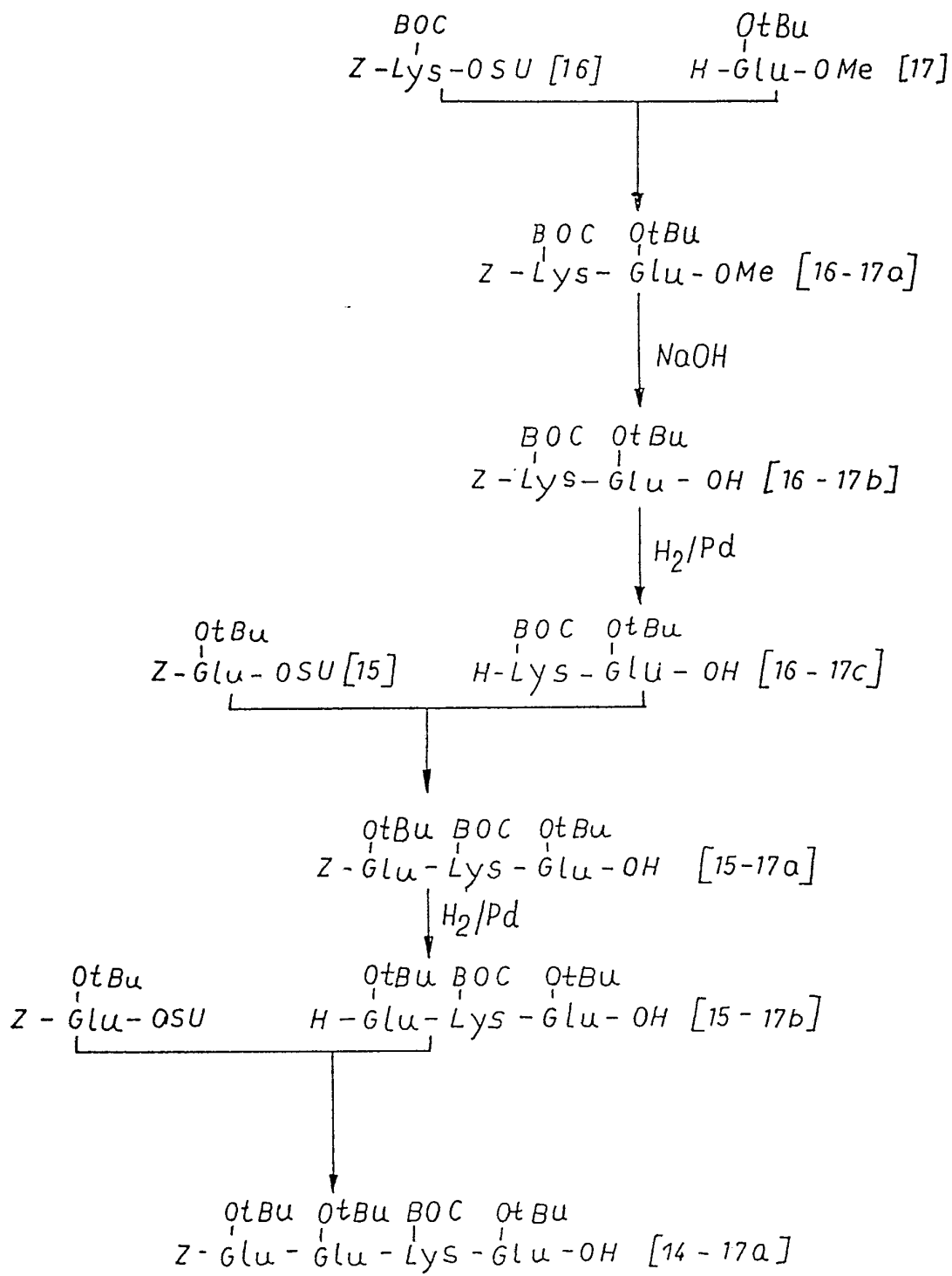


Fig. 3

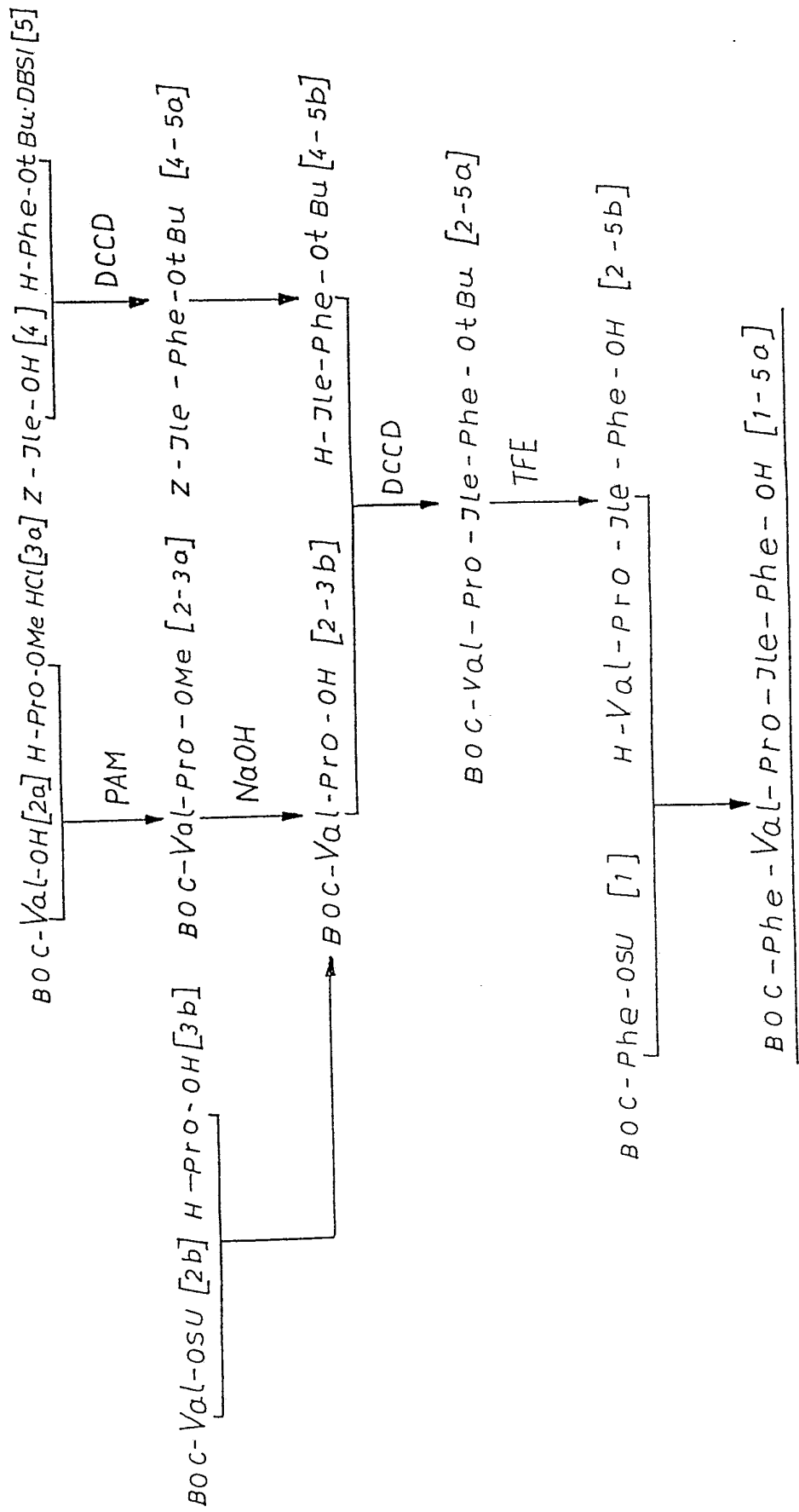


Fig. 4

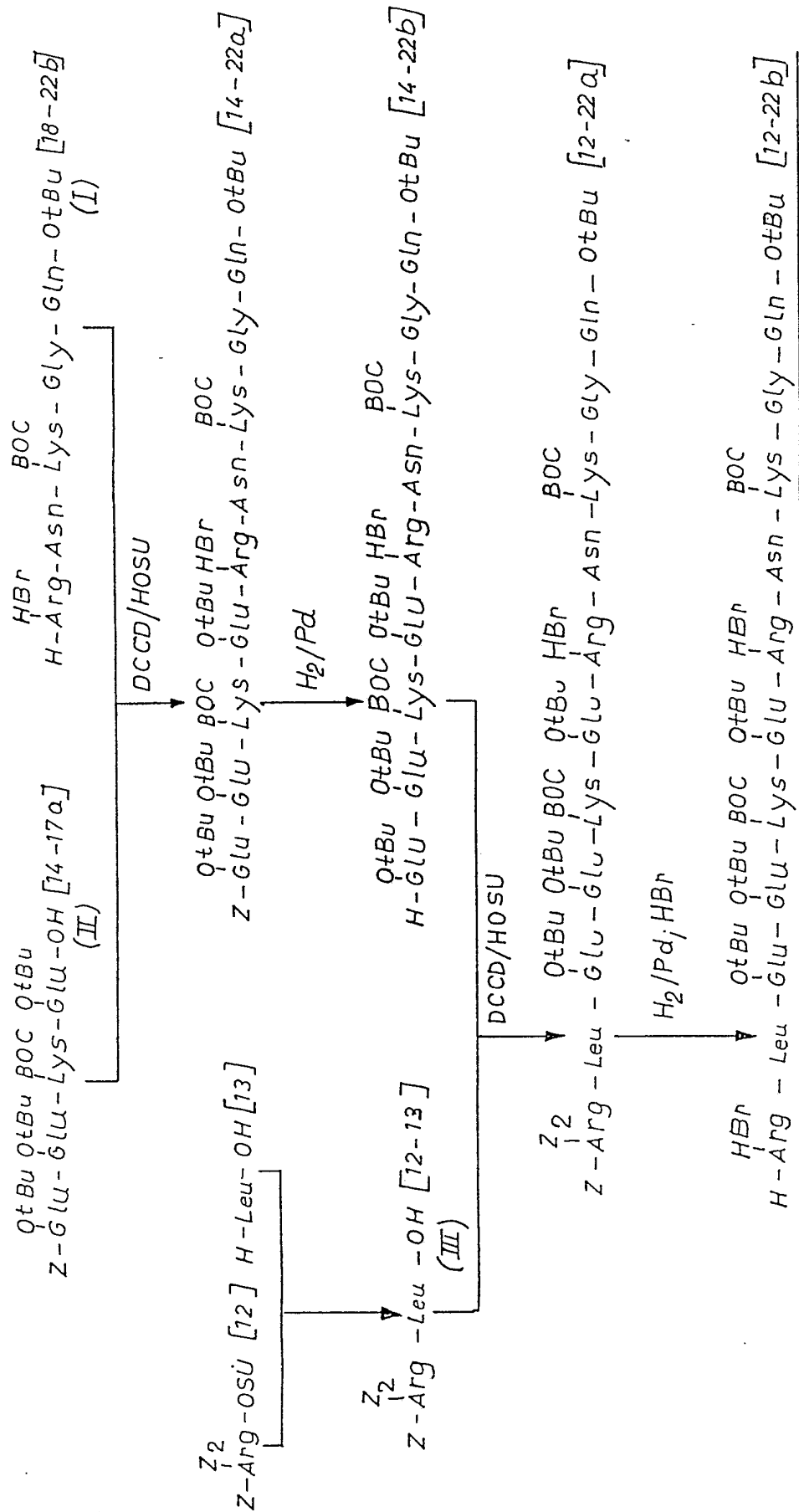


Fig. 5

