



NORGE

(19) [NO]

[B] (12) UTLEGNINGSSKRIFT (11) Nr. 166486

STYRET FOR DET
INDUSTRIELLE RETTSVERN

(51) Int. Cl.⁵ C 07 K 7/10

(21) Patentsøknad nr. 832148
(22) Inngivelsesdag 14.06.83
(24) Løpedag 14.06.83
(62) Avdelt/utskilt fra søknad nr.

(86) Internasjonal søknad nr. -
(86) Internasjonal inngivelsesdag -
(85) Videreforingsdag -
(41) Alment tilgjengelig fra 19.12.83
(44) Utlegningsdag 22.04.91

(71)(73) Søker/Patenthaver THE SALK INSTITUTE FOR
BIOLOGICAL STUDIES,
10010 North Torrey Pines Road,
La Jolla, CA 92037, US

(72) Oppfinner NICHOLAS CHAI-KWAN LING, San Diego, CA,
FREDERICK STEPHEN ESCH, Oceanside, CA,
PETER BOHLEN, Encinitas, CA,
PAUL ERNEST BRAZEAU JR., San Diego, CA,
ROGER CHARLES LOUIS GUILLEMIN, La Jolla, CA,
US

(74) Fullmektig Siv.ing. Audun Kristensen,
J.K. Thorsens Patentbureau AS, Oslo.

(30) Prioritet begjært 16.06.82, WO, nr. PCT/US82/00812,
15.09.82, US, nr. 418248.

(54) Oppfinnelsens benevnelse ANALOGIFREMGANGSMÅTE FOR FREMSTILLING AV ET
TERAPEUTISK AKTIVT PEPTID.

(57) Sammendrag Mammal-PGRF i form av syntetiske peptider som er ytterst
kraftige til å stimulere frigivelsen av hypofyse-GH i
pattedyr og som har formel:

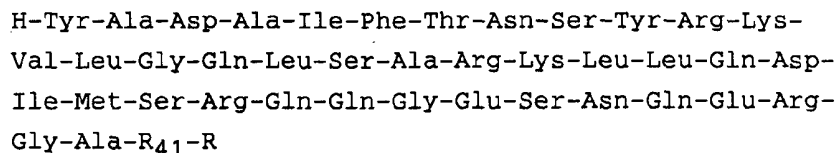
H-Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-
Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-Ser-
Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-R₃₄-Asn-Gln-Glu-R₃₈-Gly-R₄₀-
R₄₁-R- hvori R er OH eller NH₂, R₃₄ er Ser eller Ala,
R₃₈ er Arg eller Ser, R₄₀ er Ala eller Arg og R₄₁ er
Arg, Arg-Ala, Arg-Ala-Arg, Arg-Ala-Arg-Leu eller des-R₄₁.

Disse peptider eller biologisk aktive fragmenter derav med
velkjente substitusjoner og/eller addisjoner, såvel som
ikke-giftige salter av hvilken som helst av de foregående
substanser, kan tilføres terapeutisk til pattedyr, inklu-
sive mennesker og kan anvendes diagnostisk. Peptidene er
nyttige til å stimulere frigivelse av GH og akselere vekst
i varmblodige ikke-humane dyr og til bruk ved aquia-kultur.

Fremstillingen av forbindelsene er beskrevet.

(56) Anførte publikasjoner Ingen.

Foreliggende oppfinnelse vedrører en analogifremgangsmåte for fremstilling av et terapeutisk aktivt peptid med formel (I)



eller biologisk aktive fragmenter derav, hvor R er OH eller NH₂ og R₄₁ er Arg, Arg-Ala, Arg-Ala-Arg, Arg-Ala-Arg-Leu eller des-R₄₁, og det karakteristiske ved oppfinnelsen er som angitt i patentkravet.

Det ved fremgangsmåten i henhold til oppfinnelsen fremstillbare peptid har innvirkning på funksjonen av hypofysen i mennesker og dyr ved at det fremmer frigivelsen av veksthormon fra hypofysen.

Siden tidlig i 50-årene har fysiologer og leger erkjent at hypothalamus i hjernen styrer alle de sekretoriske funksjoner i adenohipofysen. Denne kontroll er nevrohumoral, med spesialiserte nevrosekretoriske nevroner og hypothalamus som fremstiller spesielle polypeptider og virkningen og rollen for hvert av disse er å igangsette akutt og kronisk sekresjon av hvert hypofysehormon. Til nå har en hypothalamisk frigivende faktor vært karakterisert som hypofysehormonene tyrotropin og prolaktin (tripeptidet TRF), for hypofysegonadotropiner luteiniserende hormon og follikkelstimulerende hormon (dekapeptidet LRF, LH-RH, GnRH eller Gn-RF) og for hypofysehormonene β -endorfin og adrenocorticotropin (det 41-aminosyre polypeptid CRF). I tillegg har en inhiberende faktor vært karakterisert: hypothalamisk somatostatin som i hypofysesammenheng inhiberer sekresjonen av veksthormon. Hver av disse hypothalamiske frigivende faktorer og somatostatin har vært reprodusert ved totalsyntese og mange analoge av de native strukturer er blitt syntetisert, enkelte med langt større aktivitet enn de naturlige forbindelser.

Hittil er ikke en tilsvarende hypothalamisk frigivende faktor for hypofyse-veksthormonet eller somatotropin blitt karak-

166486

2

terisert, selv om der har vært utstrakt fysiologisk og klinisk bevis for dets eksistens. Et av de vesentlige problemer ved isolering og karakterisering av den hypotalamiske veksthormon-frigivende faktor (i det følgende GRF) er at det aktive peptid synes å være tilstede i hvert hypotalamisk fragment i infinitesimale mengder som antas å være av størrelsesorden 50-150 femtomol. Dette er langt mindre enn noen gang beregnet for de andre hypotalamiske frigivende faktorer. I samsvar med dette er notatet om at hypotalamisk GRF har ytterst høy potens.

Et annet vesentlig problem ved isolasjonen av hypotalamisk GRF er nærværet i hypotalamiske ekstrakter av meget store mengder somatostatin som selvfølgelig forhindrer eller gir avvikende resultater ved enhver forsøkt bioassay. I løpet av de siste år har flere laboratorier påstått å ha isolert og karakterisert hypotalamisk GRF. Alle disse påstander viste seg siden å være feilaktige Schally A.V.S. et al. J. Biol. Chem. 246, 6647, 1971; Veber D.F. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 45, 235, 1971). Slike uriktige påstander kan delvis forklares ved vanskeligheten med bioassay av frigivning av veksthormon.

Et 44-rest polypeptid er blitt isolert fra human øycelle-tumor, rensset, karakterisert, syntetisert og testet og som fremmer frigivelse av veksthormon (GH) av hypofysen. Dette peptid har sekvensen:

H-Tyr-Ala-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-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Ser-Asn-Gln-Glu-Arg-Gly-Ala-Arg-Ala-Arg-Leu-NH₂.

Det antas å være og refereres i det følgende til som PGRF (human pankreatisk GRF) og benevnes også somatokrinin. To andre høyrensede peptider ble også isolert sammen med dette og som fremviser GH-frigivende aktivitet og som er PGRF (1-37) fri syre og PGRF (1-40) fri syre. Disse peptider kan anvendes for å fremme veksten av varmblodige dyr og koldblodige dyr i akvakultur.

Farmasøytiske preparater på basis av disse inkluderer PGRF, en analog eller biologisk aktive fragmenter derav, eller et ikke-giftig salt av hvilke som helst av de nevnte, dispergert i en farmasøytisk tålbart væskeformet eller fast bærer. Slike farmasøytiske preparater kan anvendes i klinisk medisin, både human- og veterinærmedisin, ved akutt eller kronisk tilførsel for diagnostiske eller terapeutiske formål.

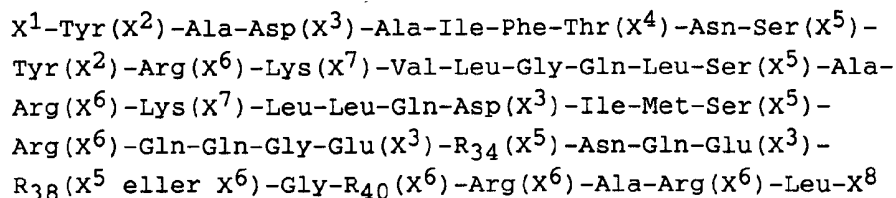
Nomenklaturen anvendt for å definere peptidene er den som spesifiseres av Schroder & Lubke, "The Peptides", Academic Press (1965) hvor i samsvar med vanlig representasjon aminogruppen ved N-enden vises til venstre og karboksylgruppen ved C-enden til høyre. Hvor aminosyreresten har isomer form er det L-formen av aminosyre som er representert med mindre annet uttrykkelig er angitt.

Peptidene syntetiseres ved hjelp av en passende metode, f.eks. ved eksklusiv fastfaseteknikk, ved delvis fastfaseteknikk, ved fragmentkondensering, ved klassiske oppløsningskoblinger, eller ved anvendelse av nylig utviklet rekombinant DNA-teknikk. F.eks. er teknikken for eksklusiv fastfase-syntese angitt i læreboken "Solid-phase Peptide Synthesis", Stewart & Young, Freeman & Co., San Francisco, 1969 og er eksemplifisert ved læren i US patentskrift nr. 4.105.603 Vale et al. Fragmentkondensering-syntesemetoden er eksemplifisert i US patentskrift nr. 3.972.859. Andre tilgjengelige synteser er eksemplifisert i US patentskrift nr. 3.842.067 og 3.862.925. Fremstilling av de syntetiske peptider under anvendelse av rekombinant DNA-teknikk kan sannsynligvis anvendes for å tilfredsstille krav til produksjon i stor skala.

Felles ved koblingstype-syntesen er beskyttelsen av de labile sidekjedegrupper av de forskjellige aminosyredeler med passende beskyttende gruppe som vil forhindre en kjemisk reaksjon fra å foregå ved dette punkt inntil gruppen endelig fjernes. Vanligvis er dette også felles ved beskyttelsen av en α -aminogruppe på en aminosyre eller et fragment mens

enheten reagerer ved karboksylgruppen, etterfulgt av den selektive fjernelse av den α -aminobeskyttende gruppe for å tillate påfølgende reaksjon å foregå på dette sted. Det er følgelig vanlig at man fremstiller en utgangsforbindelse som et trinn i syntesen og denne inkluderer hver av aminosyre-restene lokalisert i den ønskede sekvens i peptidkjeden med sidekjedegruppe knyttet til de tilhørende rester.

Som utgangsforbindelse anvendes et peptidmellomprodukt med formel:



hvor X^1 er hydrogen eller en α -aminobeskyttende gruppe. De α -aminobeskyttende grupper som omfattes av X^1 er dem som er kjent å være nyttige innenfor trinnvis syntese av polypeptider. Blant klassene av α -aminobeskyttende grupper som dekkes av X^1 er (1) acyltype-beskyttende grupper som formyl, trifluoracetyl, ftalyl, toluensulfonyl (Tos), benzensulfonyl, nitrofenylsulfonyl, tritylsulfonyl, o-nitrofenoksyacetyl, kloracetyl, acetyl og α -klorbutyryl; (2) aromatiske uretan-typebeskyttende gruppe som benzyloksykarbonyl (Z) og substituert Z, som p-klorbenzyloksykarbonyl, p-nitrobenzyloksykarbonyl, p-brombenzyloksykarbonyl, p-metoksybenzyloksykarbonyl; (3) alifatiske uretanbeskyttende grupper som t-butyloksykarbonyl (BOC), diisopropylmetyloksykarbonyl, isopropyloksykarbonyl, etoksykarbonyl allyloksykarbonyl, (4) cykloalkyl-uretan-typebeskyttende grupper som syklopentyloksykarbonyl, adamantyloksykarbonyl og sykloheksyloksykarbonyl; (5) tiouretan-typebeskyttende grupper som fenyltiokarbonyl; (6) alkyl-typebeskyttende grupper som trifenylmetyl (trityl), benzyl; (7) trialkylsilan-grupper som trimetylsilan. Den foretrukne α -aminobeskyttende gruppe er BOC.

X² er en beskyttende gruppe for den fenoliske hydroksyl-gruppe i Tyr valgt fra gruppen bestående av tetrahydro-pyranyl, tert-butyl, trityl, Bzl, CBZ, 4Br-CBZ og 2,6-diklorbenzyl. Den foretrukne beskyttende gruppe er 2,6-diklorbenzyl. X² kan være hydrogen som betyr at der ikke er noen beskyttende grupper på hydroksyl-gruppen.

X³ er hydrogen eller esterdannende beskyttende gruppe for karboksyl-gruppen i Asp eller Glu og er valgt fra gruppen bestående av Bzl, 2,6-diklorbenzyl, metyl og etyl.

X⁴ og X⁵ er beskyttende grupper for hydroksyl-gruppen i Thr og Ser og velges fra gruppen bestående av acetyl, benzoyl, tert-butyl, trityl, tetrahydropyranyl, Bzl, 2,6-diklorbenzyl og CBZ. Den foretrukne beskyttende gruppe er Bzl. X⁴ og/eller X⁵ kan være hydrogen som betyr at der ikke er noen beskyttende gruppe på hydroksyl-gruppen.

X⁶ er en beskyttende gruppe for guanidino-gruppen på Arg valgt fra gruppen bestående av nitro, Tos, CBZ, adamantyl-oksykarbonyl og BOC, eller er hydrogen;

X⁷ er hydrogen eller en beskyttende gruppe for sidekjede-aminosubstituenten i Lys. Illustrerende for egnede sidekjedeaminobeskyttende grupper er 2-klorbenzyloksykarbonyl (2-Cl-Z), Tos, CBZ, t-amyloksykarbonyl og BOC.

Seleksjonen av en sidekjede-aminobeskyttende gruppe er ikke kritisk bortsett fra at den må være en som ikke fjernes under avbeskyttelsen av α -aminogruppene under syntesen. Følgelig kan den α -aminobeskyttende gruppe og den sidekjede-beskyttende gruppe ikke være den samme.

X⁸ velges fra klassen bestående av en klormetylert harpiks eller en MBHA-harpiks.

Ved formelen for utgangsforbindelsen vil minst en av X¹, X², X³, X⁴, X⁵, X⁶, X⁷ og X⁸ være en beskyttende gruppe.

Ved seleksjon av en spesiell sidekjedegruppe som skal anvendes ved syntese av peptidene følges følgende regler:

- (a) den beskyttende gruppe bør være stabil overfor reagenset og under reaksjonsbetingelsene valgt for å fjerne den α -aminobeskyttende gruppe ved hvert trinn i syntesen,
- (b) den beskyttende gruppe bør bibeholde sine beskyttende egenskaper og ikke avspaltes under koblingsbetingelser, og
- (c) den sidekjede-beskyttende gruppe skal være fjernbar etter fullføring av syntesen inneholdende den ønskede aminosyresekvens under reaksjonsbetingelser som ikke vil endre peptidkjeden.

Peptidene blir foretrukket fremstilt under anvendelse av fastfasesyntese, f.eks. den som er beskrevet av Merrifield J. Am. Chem. Soc., 85, side 2149 (1963), selv om andre ekvivalente kjemiske synteser kjent på området også kan anvendes som tidligere nevnt. Fastfasesyntesen igangsettes fra C-enden av peptidet ved å koble en beskyttet α -aminosyre til en passende harpiks. Et slikt utgangsmaterial kan fremstilles ved å knytte α -aminobeskyttet Leu eller Ala med en esterbinding til en klormetylert harpiks eller en hydroksymetyl-harpiks. Fremstillingen av hydroksymetyl-harpiksen er beskrevet av Bodansky et al., Chem. Ind. (London) 38, 1597-98 (1966). Klormetylerter harpikser kan fås i handelen fra Bio Rad Laboratories, Richmond, California og fra Lab. Systems, Inc. Fremstillingen av en slik harpiks er beskrevet av Stewart et al., "Solid Phase Peptide Synthesis" (Freeman & Co., San Francisco 1969) kapitel 1, sidene 1-6. BHA- og MBHA-harpiks-bærere kan fås i handelen og anvendes generelt bare når det ønskede polypeptid som syntetiseres har et α -karboksamid ved C-enden.

Ala beskyttet mot BOC kobles til den klormetylerter harpiks i samsvar med metoden til Monahan og Gilon, Biopolymer 12, sidene 2513-19, 1973 når det f.eks. ønskes å syntetisere 40-aminosyrepeptidet. Etter koblingen av BOC-Ala til harpiks-bæreren fjernes den α -aminobeskyttende gruppe, f.eks. ved anvendelse av trifluoreddiksyre (TFA) i metylenklorid, TFA

alene eller HCl i dioksan. Avbeskyttelsen gjennomføres ved en temperatur på mellom 0°C og romtemperatur. Andre standard spaltningsreagenser og betingelser for fjernelsen av spesifikke α -aminobeskyttende grupper kan anvendes som beskrevet i Schroder & Lubke, "The Peptides", 1, sidene 72-75 (Academic Press 1965).

Etter fjernelsen av den α -aminobeskyttende gruppe i Ala blir de resterende α -amino- og sidekjede-beskyttede aminosyrer koblet trinnvis i den ønskede rekkefølge til å oppnå utgangsforbindelsen definert i det foregående, eller som et alternativ til å tilsette hver aminosyre separat i syntesen kan enkelte av dem kobles til hverandre før tilsetningen til fastfasereaktoren. Seleksjonen av et passende koblingsmiddel hører til kjent teknikk for den fagkyndige. Spesielt egnet som koblingsmiddel er N,N'-dicykloheksylkarbodiimid (DCCI).

De aktiverende reagenser som anvendes ved fastfasesyntesen av peptidene er vel kjent innenfor peptidteknikken. Eksempler på passende aktiveringsreagenser er (1) karbodiimider som N,N'-diisopropylkarbodiimid, N-etyl-N'-(3-dimetylaminopropyl)karbodiimid, (2) cyanamider som N,N'-dibenzylcyanamid, (3) ketiminer, (4) isoksazoliumsalter som N-etyl-5-fenylisoksazolium-3'-sulfonat, (5) monocykliske nitrogenholdige heterocykliske amider med aromatisk karakter inneholdende et til fire nitrogener i ringen, som imidazolider, pyrazolider og 1,2,4-triazolider. Spesifikke heterocykliske amider som kan anvendes inkluderer N,N'-karbonyldiimidazol, N,N'-karbonyl-di-1,2,4-triazol, (6) alkoksylert acetylen som etoksyacetylen, (7) reagenser som danner et blandet anhydrid med karboksyliden i aminosyren, f.eks. etylklorformiat og isobutylklorformiat og (8) reagenser som danner en aktiv ester med karboksyliden i aminosyren, som nitrogenholdige heterocykliske forbindelser med en hydrokso-gruppe på et ring-nitrogen, f.eks. N-hydroksyftalimid, N-hydrokso-succinimid og 1-hydroksobenzotriazol (HOBT). Andre aktiverende reagenser og deres bruk ved peptidkobling er

166486

8

beskrevet av Schroder & Lubke supra, i kapitel III og av Kapoor, J. Phar. Sci., 59, side 1-27 (1970).

Hver beskyttet aminosyre eller aminosyresekvens innføres i fastfasereaktoren i et overskudd på dobbelt mengde eller mer, og koblingen kan gjennomføres i et medium av dimetylformamid (DMF):CH₂Cl₂ (1:1) eller i DMF eller CH₂Cl₂ alene. I tilfeller hvor ufullstendig kobling forekom gjentas koblingsprosedyren før fjernelse av den α -aminobeskyttende gruppe før tilkoblingen av den neste aminosyre. Vellykketheten ved koblingsreaksjonen i hvert trinn av syntesen overvåkes ved hjelp av ninhydrin-reaksjonen, som beskrevet av E. Kaiser et al. Anal. Biochem, 34, 595 (1970).

Etterat den ønskede aminosyresekvens er blitt fullført fjernes et utgangspeptid fra harpiksbæreren ved behandling med et reagens, som f.eks. flytende hydrogenfluorid, som ikke bare avspalter peptidet fra harpiksen, men også spalter alle resterende sidekjedebeskyttende grupper x^2 , x^3 , x^4 , x^5 , x^6 , x^7 og x^8 og den α -aminobeskyttende gruppe x^1 til å gi peptidet.

Som en alternativ rute kan mellomproduktpeptidet separeres fra harpiksbæreren ved alkoholyse hvorefter den isolerte C-terminale alkylester omdannes til syren ved hydrolyse. Eventuelle sidekjedebeskyttende grupper kan så avspaltes som tidligere beskrevet ved hjelp av andre kjente metoder, som katalytisk reduksjon (f.eks. Pd på BaSO₄). Ved anvendelse av hydrogenfluorid for spaltning inkluderes anisol og metyletylsulfid i reaksjonsbeholderen for passivering.

Det følgende eksempel angir den foretrukne metode for syntetisering av PGRF ved hjelp av fastfaseteknikk. Det skjønnes selvfølgelig at syntese av tilsvarende kortere peptidfragment kan gjennomføres på samme måte ved enkelt å fjerne det nødvendige antall av aminosyrer ved den ene eller den annen ende av kjeden. Det antas imidlertid hittil at

biologisk aktive fragmenter bør inneholde den indikerte sekvens ved N-enden.

EKSEMPEL I

Syntese av PGRF(1-44) fri syre med formel:

H-Tyr-Ala-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-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Ser-Asn-Gln-Glu-Arg-Gly-Ala-Arg-
Ala-Arg-Leu-OH

gjennomføres på trinnvis måte under anvendelse av en Beckman 990 Peptide Synthesizer på en klormetylert harpiks, som kan fås fra Lab Systems, Inc. inneholdende 0,9 mekv. Cl/l. Kobling av BOC-Leu til harpiksen gjennomføres ved hjelp av den generelle metode angitt av Monahan et al. i Biopolymers, bind 12 (1973) sidene 2513-2519, og resulterer i substitusjon av omtrent 0,22 mmol Leu pr gram harpiks. Alle løsningsmidler som anvendes blir omhyggelig avgasset ved gjennomspyling av en inert gass, foretrukket helium, for å sikre fravær av oksygen som uønsket kunne oksydere svovelet i Met-resten.

Etter avbeskyttelse og nøytralisering blir peptidkjeden oppbygget trinnvis på harpiksen. Avbeskyttelse, nøytralisering og addisjon av hver aminosyre gjennomføres i generelt samsvar med metoden angitt detaljert i Guillemin et al. US patentskrift nr. 3.904.594. Koblingene gjennomføres spesifikt som angitt i det følgende skjema.

SKJEMA

Trinn	Reagenser og operasjoner	Blandetid min.
1	CH ₂ Cl ₂ vasking (2 ganger)	0,5
2	50 % trifluoreddiksyre (TFA) + 5 % 1,2-etanditiol i CH ₂ Cl ₂ (1 gang)	0,5
3	50 % trifluoreddiksyre (TFA) + 5 % 1,2-etanditiol i CH ₂ Cl ₂ (1 gang)	20,0

166486

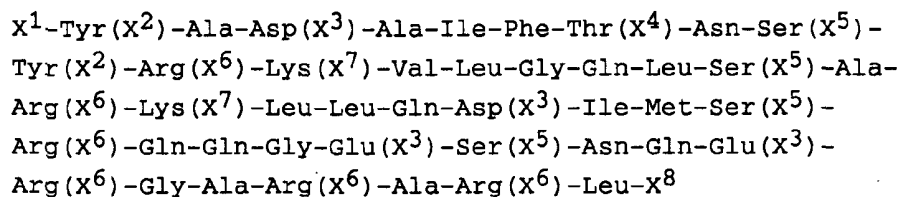
10

4	CH ₂ Cl ₂ vasking (3 ganger)	0,5
5	CH ₃ OH vasking (2 ganger)	0,5
6	10 % trietylamin (Et ₃ N) i CH ₂ Cl ₂ nøytralisering (2 ganger)	0,5
7	CH ₃ OH vasking (2 ganger)	0,5
8	10 % trietylamin (Et ₃ N) i CH ₂ Cl ₂ nøytralisering (2 ganger)	0,5
9	CH ₃ OH vasking (2 ganger)	0,5
10	CH ₂ Cl ₂ vasking (2 ganger)	0,5
11	*BOC-aminosyre (1 mmol/g harpiks) pluss ekvivalent mengde dicyklo- heksylkarbodiimid (DCC) i CH ₂ Cl ₂	120
12	CH ₂ Cl ₂ vasking (1 gang)	0,5
13	50 % dimetylformamid i CH ₂ Cl ₂ vasking (2 ganger)	0,5
14	10 % trietylamin (Et ₃ N) i CH ₂ Cl ₂ vasking (1 gang)	0,5
15	CH ₃ OH vasking (2 ganger)	0,5
16	CH ₂ Cl ₂ vasking (2 ganger)	0,5
17	25 % eddiksyreanhydrid i CH ₂ Cl ₂ (2 ml/g harpiks)	20,0
18	CH ₂ Cl ₂ (vasking 2 ganger)	0,5
19	CH ₃ OH vasking (2 ganger)	0,5

* For kobling av Asn og Gln ble et 1,136 molart overskudd av 1-hydroksybenzotriazol (HOBt) inkludert i dette trinn.

For koblingsreaksjonen anvendes kort et mmol BOC-beskyttet aminosyre i metylenklorid pr gram harpiks, pluss en ekvivalent 0,5 molar DCCI i metylenklorid eller i 30 % DMF i metylenklorid, i 2 timer. Når Arg kobles anvendes en blanding av 10 % DMF og metylenklorid. Bzl anvendes som hydroksyl-sidekjedebebyggende gruppe for Ser og Thr. 2-klorbenzyloksykarbonyl (2Cl-Z) anvendes som den beskyttende gruppe for Lys-sidekjeden. Tos anvendes for å beskytte

guanidinogruppen i Arg og Glu og Asp karboksylgruppe beskyttes som Bzl-ester. Den fenoliske hydroksylgruppe i Tyr beskyttes med 2,6-diklorbenzyl. Ved slutten av syntesen oppnås følgende sammensetning:



hvor X^1 er BOC, X^2 er 2,6-diklorbenzyl, X^3 er benzylester, X^4 er Bzl, X^5 er Bzl, X^6 er Tos, X^7 er 2Cl-Z og X^8 er en klormetylert harpiks.

Etter at den endelige Tyr-rest er blitt koblet til harpiksen fjernes BOC-gruppen med 45 % TFA i CH_2Cl_2 . For å spalte og avbeskytte den resterende beskyttede peptidharpiks behandles den med 1,5 ml anisol, 0,25 ml metyletylsulfid og 10 ml hydrogenfluorid (HF) pr gram peptidharpiks, ved -20°C , i en halv time og ved 0°C i en halv time. Etter fjernelse av HF under høyt vakuum vaskes harpiks-peptidresten vekselvis med tørr dietyleter og kloroform, og peptidet ekstraheres så med avgasset 2N vandig eddiksyre. Frysetørking av eddiksyre-ekstrakten gir et hvitt voluminøst material.

Det spaltede og avbeskyttede peptid blir så oppløst i 30 % eddiksyre og underkastet Sephadex G-50 fin gelfiltrering.

Peptidet blir så ytterligere rensset ved hjelp av CM-32 karboksymetylcellulose (Whatman) kationbytter-kromatografering ($1,8 \times 18 \text{ cm}$, $V_{\text{lag}} = 50 \text{ ml}$) under anvendelse av en konkav gradient utviklet ved å slippe 1 L $0,4 \text{ M NH}_4\text{OAc}$, pH 6,5 inn i en blandekolbe inneholdende 400 ml $0,01 \text{ M NH}_4\text{OAc}$, pH 4,5. Endelig rensing gjennomføres ved å anvende fordelings-kromatografering på Sephadex G-50 fin bærer (Pharmacia) med et $\text{nBuOH:EtOH:pyridin:0,2 \% N HOAc}$ (4:1:1:7) løsningsmiddel-system. Rensingsdetaljer er generelt angitt i Ling et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 95, 945, (1980). De kromato-

166486

12

grafiske fraksjoner overvåkes omhyggelig ved hjelp av TLC og bare de fraksjoner som viser vesentlig renhet oppsamles.

Aminosyreanalyse gjennomføres etter hydrolyse i forseglede rør under anvendelse av metoden som beskrevet i Anal. Biochem., 126, 144-156 (1982) under anvendelse av en Liquimat III aminosyre-analysator for å kontrollere at den korrekte sekvens ble oppnådd, og dette ga følgende resultater: Asx(3,62), Thr(0,75), Ser(3,5), Glx(6,83), Gly(2,87), Ala(5,10), Val(0,9), Met(1,23), Ile(1,84), Leu(5,45), Tyr(2,09), Phe(0,91), Lys(2,31) og Arg(6,61). Analysen bekreftet den riktige sekvens.

EKSEMPEL II

Syntese av PGRF(1-40) med formel:

H-Tyr-Ala-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-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Ser-Asn-Gln-Glu-Arg-Gly-Ala-OH

gjennomføres på trinnvis måte under anvendelse av Beckman 990 Peptide Synthesizer på en klormetylert harpiks på måten beskrevet i eksempel I. Peptidet forutsettes å være hovedsakelig rent under anvendelse av TLC og HPLC.

Aminosyreanalyse gjennomføres etter hydrolyse for å kontrollere at den korrekte sekvens ble oppnådd og ga følgende resultater:

Asx(389), Thr(0,88), Ser(3,66), Glx(7,04), Gly(3,07), Ala(4,02), Val(0,96), Met(1,01), Ile(1,86), Leu(4,28), Tyr(2,0), Phe(0,86), Lys(2,24) og Arg(4,15). Analyse bekreftet den korrekte sekvens.

EKSEMPEL IIA

Syntese av PGRF(1-34) fri syre med formel:

H-Tyr-Ala-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-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Ser-OH

gjennomføres på trinnvis måte under anvendelse av Beckman 990 Peptide Synthesizer på en klormetylert harpiks på samme måte som beskrevet i eksempel I. Peptidet forutsettes å være hovedsakelig rent under anvendelse av TLC og HPLC.

Aminosyreanalyse gjennomføres etter hydrolyse for å kontrollere at den korrekte sekvens ble oppnådd, og dette ga følgende resultater:

Asx(2,87), Thr(0,78), Ser(3,78), Glx(5,11), Gly(1,93), Ala(3,03), Val(0,88), Met(0,96), Ile(1,88), Leu(4,14), Tyr(2,05), Phe(1,07), Lys(2,29) og Arg(3,22). Analyse bekreftet den korrekte sekvens.

EKSEMPEL IIB

Syntese av PGRF(1-31) fri syre med formel:

H-Tyr-Ala-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-Arg-Gln-Gln-OH

gjennomføres på en trinnvis måte under anvendelse av en Beckman 990 Peptides Synthesizer på en klormetylert harpiks på samme måte som beskrevet i eksempel I. Peptidet forutsettes å være hovedsakelig rent under anvendelse av TLC og HPLC.

Aminosyreanalyse gjennomføres etter hydrolyse for å kontrollere at den korrekte sekvens ble oppnådd, og dette ga følgende resultater:

Asx(2,73), Thr(0,75), Ser(2,77), Glx(3,95), Gly(0,98), Ala(3,06), Val(0,80), Met(0,98), Ile(1,77), Leu(4,28), Tyr(2,23), Phe(1,14), Lys(2,34) og Arg(3,22). Analyse bekreftet den korrekte sekvens.

EKSEMPEL IIC

Syntese av PGRF(1-28) fri syre med formel:

H-Tyr-Ala-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-OH

166486

14

gjennomføres på en trinnvis måte under anvendelse av en Beckman 990 Peptide Synthesizer på en klormetylert harpiks på samme måte som beskrevet i eksempel I. Peptidet forutsettes å være hovedsakelig rent under anvendelse av TLC og HPLC.

Aminosyreanalyse gjennomføres etter hydrolyse for å kontrollere at den korrekte sekvens ble oppnådd, og dette ga følgende resultater:

Asx(2,66), Thr(0,73), Ser(2,66), Glx(1,98), Gly(0,81), Ala(2,89), Val(0,90), Met(1,15), Ile(1,72), Leu(4,14), Tyr(2,43), Phe(1,58), Lys(2,15) og Arg(2,19). Analyse bekreftet den korrekte sekvens.

EKSEMPEL III

Syntese av PGRF(1-44)-amid med formel:

H-Tyr-Ala-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-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Ser-Asn-Gln-Glu-Arg-Gly-Ala-Arg-Ala-Arg-Leu-NH₂

gjennomføres på trinnvis måte under anvendelse av en Beckman 990 Peptide Synthesizer på en MBHA-harpiks på samme måte som beskrevet i eksempel I. Peptidet antas å være hovedsakelig rent under anvendelse av TLC og HPLC.

Aminosyreanalyse gjennomføres etter hydrolyse for å kontrollere at den korrekte sekvens ble oppnådd, og dette ga følgende resultater:

Asx(3,75), Thr(0,80), Ser(3,60), Glx(6,98), Gly(3,16), Ala(5,04), Val(0,77), Met(1,02), Ile(1,79), Leu(5,41), Tyr(2,03), Phe(0,84), Lys(2,39) og Arg(6,43). Analyse bekreftet den korrekte sekvens.

EKSEMPEL IV

Syntese av PGRF(1-40)-amid med formel:

H-Tyr-Ala-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-
Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Ser-Asn-Gln-Glu-Arg-Gly-Ala-NH₂

gjennomføres på trinnvis måte under anvendelse av en Beckman 990 Peptide Synthesizer og en MBHA-harpiks på den måte som er beskrevet i eksempel I. Dette peptid forutsettes å være hovedsakelig rent under anvendelse av TLC og HPLC. Aminosyreanalyse gjennomføres etter hydrolyse for å kontrollere at den korrekte sekvens ble oppnådd, og dette ga følgende resultater:

Asx(3,76), Thr(0,88), Ser(3,68), Glx(6,89), Gly(3,12),
Ala(4,08), Val(0,88), Met(1,36), Ile(1,76), Leu(4,24),
Tyr(2,00), Phe(0,80), Lys(2,32) og Arg(4,16). Analyse
bekreftet den korrekte sekvens.

EKSEMPEL V

Syntese av PGRF(1-37) fri syre med formel:

H-Tyr-Ala-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-
Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Ser-Asn-Gln-Glu-OH

gjennomføres på en trinnvis måte under anvendelse av en Beckman 990 Peptide Synthesizer på en klormetylert harpiks på samme måte som beskrevet i eksempel I. Peptidet antas å være hovedsakelig rent under anvendelse av TLC og HPLC.

Aminosyreanalyse gjennomføres etter hydrolyse for å kontrollere at den korrekte sekvens ble oppnådd, og dette ga følgende resultater:

Asx(3,92), Thr(0,79), Ser(3,61), Glx(7,05), Gly(1,97),
Ala(3,17), Val(1,03), Met(1,0), Ile(1,91), Leu(4,37),
Tyr(1,86), Phe(0,76), Lys(2,15) og Arg(3,40). Analyse
bekreftet den korrekte sekvens.

166486

16

EKSEMPEL VA

Syntese av PGRF(1-37)-amid med formel:

H-Tyr-Ala-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-
Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Ser-Asn-Gln-Glu-NH₂

gjennomføres på en trinnvis måte under anvendelse av Beckman 990 Peptide Synthesizer på en MBHA-harpiks på samme måte som beskrevet i eksempel I. Peptidet forutsettes å være hovedsakelig rent under anvendelse av TLC og HPLC.

Aminosyreanalyse gjennomføres etter hydrolyse for å kontrollere at den korrekte sekvens ble oppnådd, og dette ga følgende resultater:

Asx(4,02), Thr(0,80), Ser(3,49), Glx(6,90), Gly(1,92),
Ala(3,08), Val(1,05), Met(1,01), Ile(1,77), Leu(4,05),
Tyr(2,02), Phe(1,14), Lys(2,50) og Arg(3,27). Analyse bekreftet den korrekte sekvens.

EKSEMPEL VI

For å bestemme effektiviteten av peptidene for å fremme frigivelse av veksthormon ble in vitro bedømmelsen foretatt under anvendelse av syntetisk PGRF(1-40) i samsvar med eksempel II i side-ved-side-sammenligning med ekvimolare konsentrasjoner av ekstrahert og rensset nativt PGRF(1-4) og en GRF sammenligningsstandard med en kjent effektivitet for å fremme frigivelse av veksthormon fra hypofyseceller. GRF sammenligningsstandard er beskrevet og definert i Brazeau, et al., Endocrinology, bind 110, A538(1982) og er en mengde av et preparat fra rotte-hypofyse som frembringer en halvveis maksimal respons med hensyn til GH-frigivning ved en hypofyse-cellemonolag-bioassay. Det anvendes kulturer som inkluderer celler av rotte-hypofysekjertler fjernet omtrent 4-5 døgn tidligere. Begge kulturer av definert standard medium og kulturer som anses optimale for sekresjon av

veksthormon anvendes for den komparative testing, på den generelle måte beskrevet i Brazeau, et al. Regulatory Peptides, 1, 255, 1981. Inkubasjon med substansen som skulle testes gjennomføres i 3 - 4 timer og delp prøver av dyrkingsmediet fjernes og behandles for å måle deres innhold av immuno-reaktiv GH(ir GH) ved hjelp av en velkarakterisert radioimmunoassay.

Resultatene av denne sammenlignende testing viser at med ekvimolare forhold har syntetisk PGRF(1-40) full biologisk aktivitet av det native peptid, som vist i tabell I. ED₅₀ av det syntetiske peptid er omtrent 113 picogram, som er langt mer kraftig enn et hvilket som helst annet molekyl som tidligere er påstått å ha en GH-frigivende faktor.

TABELL I

<u>GRF sammenligningsstandard</u>	<u>GH-sekresjon in vitro % av kontroller</u>
0,63 enhet	173 ± 0,4
1,25 enhet	230 ± 5
2,50 enhet	347 ± 13
5,00 enhet	474 ± 3
10,00 enhet	674 ± 6
<u>Nativt PGRF(1-40)</u>	<u>GH-sekresjon in vitro % av kontroller</u>
12,5 femtomol	234 ± 17
25 fmol	351 ± 7
50 fmol	528 ± 16
100 fmol	720 ± 32
200 fmol	748 ± 7
<u>Syntetisk PGRF(1-40)</u>	
10 fmol	269 ± 20
100 fmol	701 ± 6
1000 fmol	990 ± 42

166486

18

I tillegg til in vitro tester for sekresjon av veksthormon ble det også gjennomført in vivo forsøk ved å injisere det syntetiske peptid i normale hanrotter med kroppsvekt omtrent 200 g, bedøvet med pentobarbital. Resultatene angitt i tabell II viser at det syntetiske PGRF-peptid er en kraftig stimulator for sekresjon av hypofyse-veksthormon.

TABELL II

In vivo virkninger av syntetisk PGRF(1-40) på frigivelsen av hypofyse-veksthormon etter en enkel intravenøs injeksjon i normale rotter (4 dyr pr behandlingsdose).

<u>Doser</u>	Reaksjoner i serum ir-GH i nanogram/ml ved indikerte tidspunkter før og etter <u>injeksjon</u>					
	-1 min	+5 min	+10 min	+15 min	+30 min	+60 min
0 mikrogram	173+ 47	251+ 81	339+139	396+121	749+440	316+ 76
0,01 µg	173+ 23	284+ 20	238+ 51	201+ 47	261+ 50	299+ 25
0,1 µg	276+126	694+246	582+290	758+562	280+ 70	424+129
1,0 µg	142+ 24	455+1825	1748+564	730+158	234+ 53	267+129
10,0 µg	234+ 76	7077+1943	4676+585	2464+378	616+112	223+ 26

Ytterligere testing viser at syntetiske fragmenter fra eksempler V og VA også fremviser meget vesentlig biologisk potens. Videre har PRGF(1-40)-peptid med α-karboksamidet med C-enden fra eksempel IV hovedsakelig den dobbelte biologiske potens som det syntetiske peptid testet i eksempel VI.

EKSEMPEL VII

In vitro-bedømmelsene beskrevet i eksempel VI ble gjentatt under anvendelse av nativt PGRF(1-40) og nativt PGRF(1-44) og resultatene viste at nativt PGRF(1-44) har mer enn omtrent den dobbelte biologiske potens.

Ytterligere testing viser at syntetisk PGRF(1-44) fri syre som syntetisert i eksempel I fremviser noe mindre potens enn

nativt PGRF(1-44) og at syntetisk PGRF(1-44)-amid fremviser hovedsakelig den samme potens som nativt PGRF(1-44). Syntetisk PGRF(1-44)-amid, ved injeksjon i laboratoriedyr (rotter) viser den samme type av GH-frigivende aktivitet som fremvises av PGRF(1-40) i tabell II i eksempel VI, men er omtrent 2,5 - 3,0 ganger mer potent på vektbasis enn PGRF(1-40) fri syre.

Omtrent 1 av 7.000 til 15.000 barn født i USA er kjent å være hypofyse-veksthormondefisiente eller "hypofysedverger", det vil si de er dverger på grunn av at de mangler de normale innhold av hypofyse-GH i deres blod. Der er kliniske grunner til å anta at de fleste av disse pasienter har en normal hypofyse-kjertel og at grunnen til deres problem er mangel enten på syntese, eller på sekresjon av hypofyse-frigivende faktor for GH. Syntetisk PGRF forventes å være den ideelle behandling for disse tilfeller som tidligere er blitt behandlet med injeksjoner av human-hypofyse-GH, et ytterst dyrt preparat oppnådd utelukkende fra human-hypofyser ved obduksjoner. Human-GH fremstilt ved DNA-rekombinant metode, selv om dette er opplyst i litteraturen, er ikke for tiden tilgjengelig for rutineformål. Syntetisk PGRF er et mye enklere molekyl og bør ha vesentlige fordeler for bruk over hele verden hvor antallet av slike hypofysedverger antas å være flere hundre tusen.

På grunn av at syntetisk PGRF er det første kjente molekyl som spesifikt fremmer hypofysefunksjonen med hensyn til GH-sekresjon, representerer det således den første rutinetest for GH-sekresjon i alle tilfeller hvor en spesifikk defekt av hypofysefunksjonen mistenkes av en lege. Syntetisk PGRF bør derfor erstatte de omstendige metoder som i dag anvendes (arginin-infeksjoner, hypoglycemi, L-DOPA-injeksjoner etc.) for å bedømme GH-sekresjonsevnen som en diagnosemetode.

Syntetisk PGRF bør være av interesse i alle tilfeller i klinisk medisin hvor en lege ønsker å begunstige en positiv nitrogenbalanse og anabolisme, som f.eks. ved sårhelbredelse,

behandling av store brannskader, post-operative perioder som følger store operasjoner og andre medisinske situasjoner med debilitering, inklusive mange syndromer for gerontologisk praksis som såvel som pediatrik praksis for fortidligfødte barn. Stimulering av GH-sekresjon er av interesse i pasienter under og etter kraftig stråleterapi for faste tumorer, også her for å fremme anabolisme og også å trekke fordel av virkningene av GH på stimuleringen av stammecellene i det hematopoetiske system. For tilførsel til mennesker, bør syntetiske PGRF-peptider ha en renhet på minst 93 % og foretrukket minst 98 %. Denne renhet betyr at det ønskede peptid utgjør den angitte vektprosent av alle lignende peptider og peptidfragmenter som er tilstede.

De fleste av de biologisk aktive peptider er funnet å ha andre biologiske aktiviteter enn dem som de opprinnelige ble påtenkt for. På bakgrunn av slike forhold er det sannsynlig at PGRF vil bli funnet å ha ekstra-hypofyseaktiviteter som kan være av praktisk interesse. Selv om PGRF ble ekstrahert og isolert fra en human pankreas-tumor, på basis av samlet erfaring og forsøk, antas det at aminosyresekvensen i PGRF(1-44)-amid er den samme som sekvensen av human hypotalamisk GH-frigivende faktor. Stadig tilførsel av syntetisk PGRF-peptider til dyr i landbruket og andre varmblodige dyr forventes å fremme anabolisme og således øke kroppsvekten med hensyn til muskelmasse. Bruk i akvakultur for oppdrett av fisk og andre koldblodige marine dyr for å fremme veksten er også påtenkt. Tilførsel til dyr med en renhet så lav som omtrent 5 % kan være brukbar.

Syntetisk PGRF eller de ikke-giftige salter derav, kombinert med en farmasøytisk tålbart bærer til å danne et farmasøytisk preparat, kan tilføres pattedyr, inklusive mennesker, enten intravenøst, subkuttant, intramuskulært eller oralt. Tilførselen kan anvendes av en lege for å stimulere frigivelsen av veksthormon hvor verten som behandles krever slik terapeutisk behandling. Den nødvendige dose vil variere

med den spesielle tilstand som behandles, med alvorligheten av denne og med varigheten av den ønskede behandling.

Slike peptider tilføres ofte i form av farmasøytisk tålbare ikke-giftige salter, som syreaddisjonsalter eller metallkomplekser, f.eks. med sink, jern eller lignende (som betraktes som salter i denne forbindelse). Illustrerende for slike syreaddisjonssalter er hydrokloridet, hydrobromidet, sulfatet, fosfatet, maleinatet, acetatet, sitratet, benzoatet, sukksinatet, malatet, askorbatet, tartratet og lignende. Hvis den aktive bestanddel skal tilføres i tablettform kan tabletten inneholde et bindemiddel som tragant, maisstivelse eller gelatin, et desintegrerende middel som alginsyre, og et smøremiddel som f.eks. magnesiumstearat. Hvis tilførsel i væskeform ønskes kan et søtnings- og/eller et aromagivende middel anvendes, og intravenøs tilførsel i isotonisk saltløsning, fosfatbuffer-oppløsninger eller lignende kan gjennomføres.

Peptidene bør tilføres under oppsyn av en lege og farmasøytiske preparater vil vanligvis inneholde peptidet i forbindelse med en konvensjonell, farmasøytisk tålbart bærer. Vanligvis er doseringen fra omtrent 20 til omtrent 2.000 nanogram peptid pr kilogram kroppsvekt for verten.

PATENTKRAV

Analogifremgangsmåte for fremstilling av et terapeutisk aktivt peptid med formel (I)

H-Tyr-Ala-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-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Ser-Asn-Gln-Glu-Arg-Gly-Ala-R₄₁-R
eller biologisk aktive fragmenter derav, hvor R er OH eller NH₂ og R₄₁ er Arg, Arg-Ala, Arg-Ala-Arg, Arg-Ala-Arg-Leu eller des-R₄₁.

k a r a k t e r i s e r t v e d
dannelse av et peptidmellomprodukt inneholdende minst en beskyttelsesgruppe og med formelen (II):

166486

22

X^1 -Tyr(X^2)-Ala-Asp(X^3)-Ala-Ile-Phe-Thr(X^4)-Asn-Ser(X^5)-
Tyr(X^2)-Arg(X^6)-Lys(X^7)-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser(X^5)-Ala-
Arg(X^6)-Lys(X^7)-Leu-Leu-Gln-Asp(X^3)-Ile-Met-Ser(X^5)-Arg(X^6)-
Gln-Gln-Gly-Glu(X^3)-Ser(X^5)-Asn-Gln-Glu(X^3)-Arg(X^6)-Gly-Ala-
Arg(X^6)-Ala-Arg(X^6)-Leu-(X^8),

hvor X^1 er hydrogen eller en α -aminobeskyttende gruppe,
 X^2 er hydrogen eller beskyttelsesgruppen for fenolhydroksyl-
gruppen i Tyr,

X^3 er hydrogen eller en beskyttelsesgruppe for karboksyl-
gruppen Asp eller Glu,

X^4 er hydrogen eller en beskyttelsesgruppe for alkoholhydrok-
sylgruppen i Thr,

X^5 er hydrogen eller en beskyttelsesgruppe for alkohol-
hydroksylgruppen i Ser,

X^6 er hydrogen eller en beskyttelsesgruppe for guanidogruppen i
Arg,

X^7 er hydrogen eller en beskyttelsesgruppe for sidekjedeamino-
gruppen i Lys, og

X^8 er en klormetylert harpiks eller en MBHA-harpiks,
eller en i C-enden hensiktsmessig forkortet versjon derav, ved
at de beskyttede aminosyrer i angitt rekkefølge sammen kobles i
en mengde omtrent et millimol beskyttet aminosyre pr gram
harpiks i et passende løsningsmiddel, foretrukket

i metylenklorid eller dimetylformamid eller i en blanding
derav, og

avspalting av den eller de beskyttende gruppe(r) fra den nevnte
forbindelse med formel (II) for tilveiebringelse av et peptid
med formelen (I) eller et C-endeavkortet fragment av et slikt
peptid med biologisk aktivitet til å bevirke frigivelse av GH
og, om ønsket omdannelse av det oppnådde peptid eller
fragmenter derav til et ikke-giftig addisjonssalt.