

(19) DANMARK



Patentdirektoratet
TAASTRUP

(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 164408 B

(21) Patentansøgning nr.: 4334/85

(51) Int.Cl.5 C 07 K 7/10

(22) Indleveringsdag: 24 sep 1985

(41) Alm. tilgængelig: 25 mar 1986

(44) Fremlagt: 22 jun 1992

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 24 sep 1984 US 653163 06 aug 1985 US 762891

(71) Ansøger: *F. Hoffmann-La Roche AG; Grenzacherstrasse 124-184; 4002 Basel, CH

(72) Opfinder: Arthur Martin *Felix; US, Edgar P. *Heimer; US, Thomas F. *Mowles; US

(74) Fuldmægtig: Plougmann & Vingtoft A/S

(54) **Væksthormonfrigivende faktorforbindelser, forbindelserne til anvendelse som terapeutikum, fremgangsmåde til fremstilling af forbindelserne, farmaceutiske præparater, der indeholder en effektiv mængde af en sådan forbindelse samt anvendelse af forbindelsen**

(56) Fremdragne publikationer

EP pat. nr. 105759, 117034

(57) Sammen drag:

4334-85

Væksthormonfrigivende faktoranaloge, hvor glycin i stilling 15 er erstattet med alanin, leucin, valin, isoleucin, norleucin, norvalin, β -alanin eller α -aminoisovørsyre, og farmaceutiske præparater, som indeholder disse analoge, udviser forøget styrke i frigivelsen af væksthormon og kan administreres til mennesker, som lider af en væksthormondeficiens, og til dyr for at fremme deres vækst.

DK 164408 B

Opfindelsen angår hidtil ukendte væksthormonfrigivende faktor(GRF)-forbindelser med den almene formel I, forbindelserne til anvendelse som terapeutikum, fremgangsmåde til fremstilling af forbindelserne, farmaceutiske præparater, der indeholder en effektiv mængde af en
5 sådan forbindelse samt anvendelse af forbindelsen til fremstilling af et farmaceutisk præparat til behandling af vækstrelaterede lidelser, der er karakteriserede ved væksthormondeficienser hos mennesker, eller til behandling af dyr for at fremme deres vækst.

Væksthormonfrigivende faktor (GRF) er for nylig blevet isoleret fra
10 human "islet"-celletumor og strukturelt karakteriseret af Dr. Guillemin og dennes medarbejdere ved Salk Institute (*Science* 218, 5. november 1982, s. 585-587). Selv om isoleringen og karakteriseringen af GRF er blevet forsøgt i flere årtier, har det hidtil været uden held som følge af forekomsten af GRF i meget små mængder. Human hypothalamusvæksthormon-frigivende faktor (hGRF) har nu vist sig at have samme
15 struktur som GRF, der er isoleret fra "islet"-celletumor (Böhlen et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 114, 1983, s. 930-936).

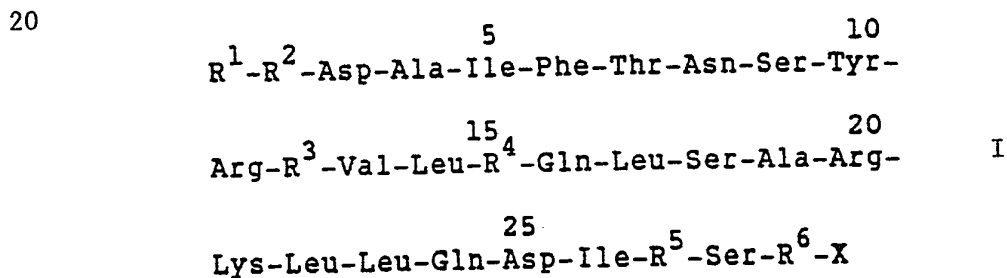
Rivier et al., *Nature* 300, 1982, s. 276-278 og Guillemin et al., *Science* 218, 1982, s. 585-587, har beskrevet strukturen af henholdsvis GRF(1-40) og GRF(1-44) og påvist, at GRF er specifik for frigivelsen af væksthormon. Disse to former af GRF er identiske ved amino(NH₂)-terminalen, men er forskellige i afslutningspunktet for carboxy(COOH)-terminalen. GRF(1-44) er yderligere karakteriseret ved at have en amidgruppe ved carboxyterminalen. Rivier et al. har på
25 vist, at den biologiske aktivitet af GRF forefindes i molekylets NH₂-terminale del, og den fulde iboende aktivitet og styrke blev påvist med GRF(1-29)-NH₂ *in vitro*.

Lance et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 119, 1984, s. 265-272, har vist, at GRF(1-29)-NH₂ med substitutioner af udvalgte aminosyrer i
30 stilling 1, 2 og 3 forårsager forøget frigivelse af væksthormon (GH) både hos svin og rotter *in vivo*. I USA-patentskrift nr. 4.518.586 beskrives forskellige syntetiske GRF-peptider, herunder substitutionen af D-Ala i stilling 15. Tilsvarende beskrives i USA-patentskrift nr. 4.528.190, der er udstedt den 9. juli 1985, forskellige GRF-analoge, herunder substitutionen af D-Ala i stilling 15.
35

I modsætning hertil er forbindelserne ifølge opfindelsen, når disse er substitueret med Ala i 15-stillingen, substitueret med L-Ala.

Vækst hos dyr reguleres formodentlig af en kaskade af bio-regulerende molekyler. Hypothalamus danner GRF, som inducerer hypofysens frigivelse af væksthormon. Små mængder GRF har vist sig at forårsage betydelig frigivelse fra hypofysen af væksthormon i blodet. Således har GRF stor terapeutisk anvendelighed i de tilfælde, hvor væksthormon er indikeret. Fx kan GRF anvendes ved behandlingen af hypofysærdværgvækst, diabetes som følge af abnormaliteter i væksthormondannelse, fremme af sårheling, behandling af brandsår og forhaling af ældningsprocessen. Tilsvarende er GRF anvendeligt inden for landbruget. Eksempler på landbrugsmæssig anvendelse omfatter forøget kødproduktion hos fjerkræ og dyr, der opdrættes til føde såsom svin, kvæg og lignende for at muliggøre tidligere markedsføring eller for at frembringe større dyr inden for det samme fodringstidsrum eller for at forbedre forholdet mellem magert kød og fedt. GRF kan også stimulere mælkeproduktion hos malkekøer og ægproduktion hos høns.

Den foreliggende opfindelse angår hidtil ukendte peptider med den almene formel I



hvor R^1 betegner Tyr, D-Tyr, desNH₂-Tyr, Ac-Tyr eller His; R^2 betegner Ala, D-Ala eller N-methyl-D-Ala; R^3 betegner Lys eller Ala; R^4 betegner Ala, Leu, Val, Ile, Nle, Nval, β -Ala eller α -Aminoisosmørsyre; R^5 betegner Met, Leu, Nle eller Ile; R^6 betegner en aminosyresekvens valgt fra Arg-Gln-Gln-Gly-Ser-Ans-Gln-Glu-Arg-Gly-Ala-Arg-Ala-Arg-Leu og fragmenter deraf, hvor sekvensen er reduceret i antal med 1-15 aminosyrerester fra carboxyenden, og X betegner enten OH eller NH₂, og hvor alle aminosyrer er L-aminosyrer medmindre andet specifikt er angivet,

farmaceutisk acceptable syre- eller baseadditionssalte deraf og farmaceutiske præparater, som indeholder disse forbindelser.

Farmaceutiske præparater ifølge opfindelsen er kendetegnet ved at indeholde GRF-analoge ifølge krav 1 med fra niogtyve (29) op til
 5 fireogfyrre (44) aminosyrerester og en ikke-toxisk, inert farmaceutisk eller veterinært acceptabelt flydende eller fast bærer. Sådanne farmaceutiske præparater kan anvendes inden for såvel human som veterinær klinisk medicin til administration til terapeutiske og/eller diagnostiske formål. De kan endvidere anvendes til at fremme
 10 væksten af varm- og koldblodede dyr.

Peptiderne ifølge opfindelsen kan anvendes ved fremgangsmåder til stimulering af frigivelsen af væksthormon fra hypofysen til anvendelse i de ovennævnte behandlinger.

I nedenstående beskrivelse og krav betegner udtrykket "GRF" human-
 15 væksthormonfrigivende faktor, som er et polypeptid med aminosyresekvens (*Science* 218, 5. november 1982, s. 585)

1	5	10	15
H-Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-			
	20	25	30
Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-Ser-Arg-Gln-			
	35	40	
Gln-Gly-Glu-Ser-Asn-Gln-Glu-Arg-Gly-Ala-Arg-Ala-Arg-Leu-NH ₂ ,			

eller biologisk aktive fragmenter deraf med i det mindste de første
 20 29 aminosyrer fra polypeptidet i fuld længde, og som udviser væksthormonfrigivende aktivitet. I overensstemmelse med sædvanlig praksis er den N-terminale aminogruppe vist til venstre, og den C-terminale carboxygruppe er vist til højre. "Aminosyre" betegner en af de naturligt forekommende aminosyrer, som typisk findes i proteiner, såsom
 25 Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, Thr, Lys, Arg, Asp, Asn, Glu, Gln, Cys, Met, Phe, Tyr, Pro, Trp og His. "Nle" betegner norleucin, og "Nval" betegner norvalin. Når aminosyreresten har isomere former, er aminosyrens L-form vist, medmindre andet specifikt er angivet. Suffikserne

"-OH" og "-NH₂" efter "GRF" betegner henholdsvis de frie syre- og amidformer af polypeptidet. I tilfælde af, at ingen af suffikserne er anvendt, skal udtrykket omfatte begge former. GRF-analoge er vist ved at angive den substituerede aminosyre i parentes før "GRF"; dvs. fx
5 "(Ala¹⁵)GRF" betegner et polypeptid med en aminosyresekvens, der svarer til GRF, hvor glycin i stilling 15 er blevet substitueret med en alaninrest. Tal i parentes efter "GRF" betegner fragmenter af polypeptidet i fuld længde ved at angive aminosyreresternes positionstal, fx betegner GRF(1-29) et fragment, der har de første 29
10 aminosyrer af hele sekvensen.

Den foreliggende opfindelse er baseret på den erkendelse, at glycinresten i stilling 15 af GRF-molekylet kan erstattes med en anden, hensigtsmæssigt udvalgt aminosyre, som danner en GRF-analog med forøget biologisk styrke ved at stimulere frigivelsen af væksthormon
15 fra hypofysen. Aminosyrer, der er indsat i stilling 15, kan vælges blandt hydrofobe aminosyrer såsom Ala, Leu, Val, Ile, Nle og Nval. α -Aminoisosmørsyre (α -Aib) og β -Alanin (β -Ala) kan også indsættes i stilling 15. GRF-analoge, hvor de hydrofobe aminosyrer såsom alanin, valin eller leucin er indsat i stilling 15, har især vist sig at have
20 forøget biologisk aktivitet ved at bevirke frigivelse af væksthormon fra hypofysen.

Der kan anvendes forskellige velkendte metoder til udvælgelse af en bestemt aminosyre til indsætning i GRF i en bestemt stilling. En sådan metode er at udvælge en erstatningsaminosyre således, at det
25 resulterende polypeptids sekundære struktur modificeres eller dets amphifile karakter ændres som vist ved helicitets- og hydropathecitetsanalyse, og endvidere reducerer den lethedegrad, med hvilken det resulterende polypeptid nedbrydes proteolytisk. Helicitets- og hydropathecitetsanalyser udføres ved velkendte sædvanlige metoder.

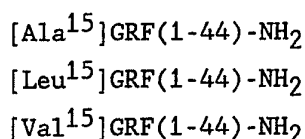
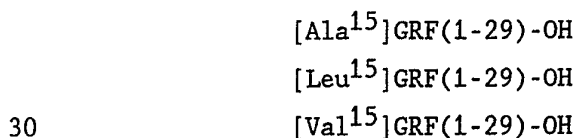
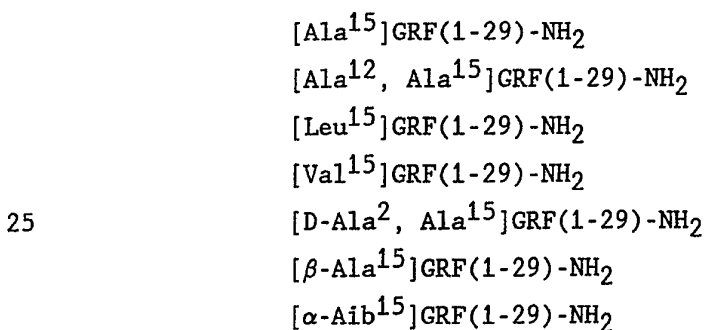
30 Yderligere erstatninger med hensigtsmæssigt udvalgte aminosyrer i stilling 15 i GRF-fragmenter med varierende længde fra ca. 29 aminosyrer til mindre end 44 aminosyrer har også vist sig at have forøget biologisk aktivitet ved at forøge GH-frigivelse fra hypofysen. Især har erstatning med hensigtsmæssigt udvalgte aminosyrer i stilling 15
35 i GRF(1-29) vist sig at have forøget biologisk aktivitet.

Yderligere erstatninger med hensigtsmæssigt udvalgte aminosyrer i andre udvalgte stillinger i GRF-molekylet samtidig med erstatningen i 15-stillingen, hvorved fås en multierstattet GRF-analog, gav peptider med biologisk styrke ved at bevirke frigivelse af GH fra hypofysen.

- 5 Udvalgte stillinger af GRF-peptidet til en anden erstatning omfatter, men er ikke begrænset til, 1-, 2-, 12- eller 27-stillingen. Udvalgte aminosyrer til indsætning i hensigtsmæssigt udvalgte stillinger omfatter tyrosin, desNH₂-tyrosin, Ac-tyrosin, histidin, lysin, alanin, β-alanin og D-aminosyrer af de beskrevne aminosyrer. Erstatninger i
- 10 hver af de udvalgte stillinger udover erstatningen i 15-stillingen kan give et disubstitueret, trisubstitueret eller tetrasubstitueret polypeptid.

- Udover erstatningen i 15-stillingen har syren eller amidet af GRF i fuld længde (1-44), det 29 aminosyrer lange GRF(1-29) eller en GRF,
- 15 som er større end ca. 29 aminosyrer og mindre end ca. 44 aminosyrer i længde, vist sig at have en forøget biologisk aktivitet. Især GRF(1-44)- og GRF(1-29)-syren og amidet, hvor en hensigtsmæssigt udvalgt aminosyre er indsat i 15-stillingen, vist sig at have forøget biologisk aktivitet.

- 20 Repræsentative forbindelser ifølge opfindelsen omfatter:



[desNH₂-Tyr¹, Ala¹⁵]GRF(1-29)-NH₂

[D-Tyr¹, Ala¹⁵]GRF(1-29)-NH₂

[Ac-Tyr¹, Ala¹⁵]GRF(1-29)-NH₂

Selv om de beskrevne modifikationer er fra den sekvens, som omfatter
 5 humanvæksthormonafgivende faktor (hGRF), kan tilsvarende modifikatio-
 ner foretages med porcinvæksthormonafgivende faktor (pGRF), bovin-
 væksthormonafgivende faktor (bGRF), ovinvæksthormonafgivende faktor
 (oGRF) og caprinvæksthormonafgivende faktor (cGRF).

Polypeptidet ifølge opfindelsen kan fremstilles i henhold til vel-
 10 kendte metoder, dvs. ved fastfasepeptidsynteseteknikker, opløstfase-
 peptidsyntese eller rekombinante DNA-metoder. Den for nylig udviklede
 rekombinante DNA-teknik kan anvendes til at fremstille analoge, der
 kun indeholder de "almindelige" aminosyrerester, eller til at frem-
 stille den del af en analog, der kun indeholder de "almindelige"
 15 aminosyrerester, som derefter kan kobles til et kort N-terminalpep-
 tid.

Peptider kan fremstilles ved fastfasesyntese, således som det er be-
 skrevet af Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 1963, s. 2149, selv om
 der kan anvendes andre ækvivalente kemiske synteser, som er kendte
 20 for fagfolk. Fastfasesyntese påbegyndes fra peptidets C-terminale
 ende ved kobling af en beskyttet aminosyre til en hensigtsmæssig har-
 piks. Der kan fremstilles et udgangsmateriale ved at fastgøre en
 aminobeskyttet aminosyre via en benzylesterbinding til en chlormethy-
 leret harpiks eller en hydroxymethylharpiks eller via en amidbinding
 25 til en benzhydrylamin (BHA)-harpiks eller methylbenzhydrylamin
 (MBHA)-harpiks. Harpikserne er kommercielt tilgængelige, og frem-
 stillingen deraf er kendt for fagfolk.

Syreformen af de hidtil ukendte analoge kan fremstilles ved fast-
 fasepeptidsyntesemetoden under anvendelse af en benzylesterharpiks
 30 som fast bærer. Polypeptidet kan oprenses til homogenitet ved præ-
 parativ højtryksvæskechromatografi (HPLC) og påvises derefter at
 være homogent ved to analytiske HPLC-systemer, isoelektrisk fokuse-
 ring og højspændings-tyndtlagsselektrophorese. Der kan foretages
 aminosyreanalyse for at bekræfte den forventede aminosyresammensæt-

ning. De tilsvarende amider kan fremstilles under anvendelse af benzhydrylamin- eller methylbenzhydrylaminharpiks som det faste underlag til fastfasepeptidsyntese. Fagfolk vil forstå, at når der anvendes BHA- eller MBHA-harpiks, medfører behandlingen med vandfrit HF til fjernelse af polypeptidet fra det faste underlag et polypeptid med en terminalamidgruppe.

En C-terminalaminosyre, fx Arg, beskyttes i N^{α} -amino- og sidekædede guanidino stillingerne med hensigtsmæssigt udvalgte beskyttelsesgrupper, fx med henholdsvis t-butyloxycarbonyl (Boc) og p-toluensulfonyl (Tos). Derefter kan Boc-Arg(Tos)-OH kobles til benzhydrylaminharpiks under anvendelse af dicyclohexylcarbodiimid (DCC) ved ca. 25°C i 2 timer under omrøring. Efter kobling af den med Boc beskyttede aminosyre til harpiksunderlaget fjernes α -aminobeskyttelsesgruppen under anvendelse af trifluoreddikesyre (TFA) i methylenchlorid eller TFA alene. Afbeskyttelsen foretages ved en temperatur mellem ca. 0°C og stuetemperatur.

Efter fjernelse af α -aminobeskyttelsesgruppen fra den til harpiksunderlaget bundne aminosyre kobles de andre Boc-beskyttede aminosyrer trinvis i den ønskede rækkefølge. I stedet for at tilsætte hver aminosyre for sig kan to eller flere aminosyrer kobles sammen på en hensigtsmæssig måde, før de sættes til fastfasesynteseapparatet. Hensigtsmæssige koblingsreagenser er kendte for fagfolk; DCC er særlig velegnet.

Hver beskyttet aminosyre eller aminosyresekvens indføres i fastfasesynteseapparatet i et overskud, og koblingen kan udføres i et medium af dimethylformamid (DMF) eller methylenchlorid (CH_2Cl_2) eller blandinger deraf. I tilfælde, hvor der forekommer utilstrækkelig kobling, gentages koblingsproceduren før fjernelse af N^{α} -aminobeskyttelsesgruppen før koblingen af næste aminosyre. Den heldige udførelse af koblingsreaktionen i hvert syntesetrin kan overvåges. En foretrukket metode til overvågning af syntesen er ninhydrinreaktionen. Koblingsreaktionerne kan udføres automatisk, fx på en Vega 250 Peptide Synthesizer.

Spaltning af det færdige peptid fra harpiksen kan udføres under anvendelse af metoder, der er velkendte inden for peptidkemien, fortrinsvis under anvendelse af vandfrit flydende hydrogenfluorid (HF). Omsætningen med hydrogenfluorid i nærværelse af p-cresol og dimethyl-

5 sulfid ved 0°C i 1 time kan efterfølges af en anden reaktion med hydrogenfluorid i nærværelse af p-cresol i 2 timer ved 0°C.

Den foreliggende opfindelse angår således også en fremgangsmåde til fremstilling af de væksthormon frigivende faktor (GFR)-forbindelser med den almene formel I som defineret ovenfor og farmaceutisk accept-

10 able syre- eller baseadditionssalte deraf. Denne fremgangsmåde er ejendommelig ved, at

a) beskyttelsesgrupperne på et hensigtsmæssigt beskyttet polypeptid med tilsvarende aminosyresekvens, hvilket polypeptid er blevet syntetiseret ved opløsningsfasepeptidsyntese, fraspaltes ved sædvanlige

15 metoder, eller

b) et hensigtsmæssigt sidekæde-beskyttet harpiksbundet polypeptid med tilsvarende aminosyresekvens, hvilket polypeptid er blevet syntetiseret ved fastfasepeptidsyntese, omsættes med vandfrit flydende HF,

20 og den vundne forbindelse med den almene formel I om ønsket omdannes til et farmaceutisk acceptabelt syre- eller baseadditionssalt.

Oprensning af polypeptiderne ifølge opfindelsen kan udføres under anvendelse af metoder, som er velkendte inden for peptidkemien. Som angivet ovenfor kan de her omhandlede polypeptider oprenses under

25 anvendelse af præparativ HPLC; imidlertid kan der også anvendes andre kendte chromatografiske metoder såsom gelpermutations-, ionbytnings- og fordelingschromatografi eller modstrømsfordeling.

Polypeptiderne ifølge opfindelsen har væksthormonfrigivende aktivitet. Farmaceutiske præparater ifølge opfindelsen indeholder en GRF-

30 analog med den almene formel I eller et ikke-toxisk salt af en sådan forbindelse dispergeret i en farmaceutisk eller veterinært acceptabel flydende eller fast bærer. Sådanne farmaceutiske præparater kan an-

vendes til terapeutiske eller diagnostiske formål inden for såvel human som veterinær klinisk medicin. Fx kan de anvendes til behandling af vækstrelaterede lidelser såsom hypofysær dværgvækst og diabetes, der er en følge af abnormalitet i væksthormondannelse. De kan
5 endvidere også anvendes til at stimulere væksten eller forøge fo-
derudnyttelsen hos dyr, der opdrættes til kødproduktion, forøge
mælkeproduktionen og stimulere ægproduktionen.

Hensigtsmæssige doser af polypeptiderne ifølge opfindelsen, der skal administreres, varierer noget afhængigt af den enkelte patient og den
10 lidelse, som skal behandles. Fagfolk vil være i stand til at bestemme
hensigtsmæssige doser baseret på de kendte cirkulationsniveauer af
væksthormon, som er forbundet med normal vækst, og polypeptidets
væksthormonfrigivende aktivitet.

Forbindelser ifølge opfindelsen inducerede en frigivelse af væksthormon *in vitro*, der var fem (5) gange større end GRF i (1-44). Disse
15 analoge kan derfor administreres i væsentligt mindre doser, end hvis
den væksthormonfrigivende faktor blev indgivet til samme formål. Det
er velkendt inden for teknikken, at behandling af vækstrelaterede
lidelser nødvendiggør varierende doser fra individ til individ af-
20 hængig af graden af utilstrækkelig væksthormondannelse. Generelt kan
der anvendes et dosisområde på fra 0,04 $\mu\text{g/kg/dag}$ til ca. 1,0 $\mu\text{g/kg/dag}$ baseret på patientens legemsvægt til stimulation af frigivelsen
af væksthormon. De doser, der anvendes til at stimulere vækstaktivi-
tet hos husdyr, vil være væsentligt højere (pr. kilo legemsvægt) end
25 de doser, der anvendes til at genvinde normalvækst i tilfælde af
væksthormondeficiens såsom hypofysær dværgvækst hos mennesker. Til
husdyr kan der generelt anvendes en dosis i området fra ca. 0,4
 $\mu\text{g/kg/dag}$ til ca. 10 $\mu\text{g/kg/dag}$ subcutant til stimulation af frigivel-
sen af væksthormon fra hypofysen.

30 Ifølge opfindelsen er der således tilvejebragt forbindelser med
formlen I til brug som terapeutikum samt anvendelse af forbindelserne
til fremstilling af et farmaceutisk præparat til behandling af
vækstrelaterede lidelser, der er karakteriserede ved utilstrækkelig
dannelse af væksthormon. Den terapeutiske anvendelse omfatter admini-
35 stration af en mængde af analogene ifølge opfindelsen, der er til-

strækkelig til at stimulere dannelsen af væksthormon i niveauer, der er forbundet med normal vækst.

Normale niveauer af væksthormon kan variere betydeligt fra individ til individ, og for et hvilket som helst givet individ varierer
5 niveauerne af cirkulerende væksthormon betydeligt i løbet af dagen. Hos voksne mennesker er normale serumniveauer af væksthormon blevet beskrevet til at variere fra ca. 0-10 nanogram/ml. Hos børn er normale serumniveauer af væksthormon blevet beskrevet at variere fra ca. 0-20 nanogram/ml.

10 For at behandle hypofysær dværgvækst effektivt med de beskrevne analoge, administreres behandling i den normale vækstperiode. Hos piger strækker denne periode sig generelt ikke langt ud over menstruationens begyndelse. Således bør behandlingen af piger udføres i alderen ca. 12-16 år afhængig af individet. Hos drenge kan stimulationen af
15 vækst fortsætte i et betydeligt længere tidsrum udover puberteten. Således vil effektiv behandling af drenge normalt være mulig op til ca. 18-19 år og i visse individuelle tilfælde op til ca. 25 år.

Opfindelsen angår også en fremgangsmåde til forøgelse af dyrs væksthastighed ved administration af en mængde af analogen, der er til-
20 strækkelig til at stimulere dannelsen af væksthormon i et niveau, som er højere end det, der er forbundet med normal vækst.

Polypeptiderne ifølge opfindelsen kan administreres i form af humane eller veterinære farmaceutiske præparater, der kan fremstilles ved sædvanlige farmaceutiske formuleringsteknikker. Der kan anvendes
25 præparater, som egner sig til oral, intravenøs, subcutan, intramuskulær, intraperitoneal eller intranasal administration. En hensigtsmæssig dosisform til farmaceutisk anvendelse er fra ca. 0,01 til ca. 0,5 mg af en forbindelse ifølge opfindelsen, der kan lyofiliseres til rekonstitution med sterilt vand eller saltopløsning. Præparatet bør
30 holdes ved en pH under ca. 8,0 for at bevare analogens stabilitet. Serumalbumin fra den art, der behandles (fx human serumalbumin i tilfælde af mennesker, bovinserumalbumin i tilfælde af køer osv.), kan også være til stede sammen med andre kendte farmaceutiske adjuvanser.

Opfindelsen belyses nærmere ved nedenstående eksempler.

I eksemplerne blev der anvendt optisk aktive beskyttede aminosyrer i L-konfiguration, medmindre andet specifikt er angivet. De beskyttede aminosyrer blev undersøgt ved tyndtlagschromatografi på silicagel

5 G-plader og elueret med chlor/N,N,N',N'-tetramethyl-4,4'-diamino-diphenylmethan (TDM). Smeltepunkter blev bestemt på et Thomas-Hoover-apparat (ukorrigeret), og optisk rotation blev målt i en med kappe forsynet 10-centimeters celle på en Perkin-Elmer model 141 polarimeter og bragt i overensstemmelse med de accepterede værdier.

10 Aminosyreanalyse blev udført på et Waters aminosyreanalyseapparat.

I eksemplerne anvendes følgende forkortelser til at betegne forskellige beskyttelsesgrupper og reagenser:

	BOC	=	t-butyloxycarbonyl
	Z	=	benzyloxycarbonyl
15	2ClZ	=	2-chlorbenzyloxycarbonyl
	Bzl	=	benzyl
	2,6-Cl ₂ -Bzl	=	2,6-dichlorbenzyl
	Tos	=	p-toluensulfonyl
	DCC	=	dicyclohexylcarbodiimid
20	BHA	=	benzhydrylamin
	DMF	=	dimethylformamid
	TFA	=	trifluoreddikesyre
	TGA	=	thioglycolsyre

Analogene ifølge opfindelsen blev fremstillet ved sekventiel kobling

25 af aminosyrer under anvendelse af en kommercielt tilgængelig automatiseret fastfasepeptidsynthesizer (Vega 250 Peptide Synthesizer). N^α-Boc-aminosyrer blev anvendt i syntesen.

Trifunktionelle aminosyrer blev beskyttet som N^α-Boc-Lys(2ClZ), N^α-Boc-Asp(OBzl), N^α-Boc-Glu(OBzl), N^α-Boc-Ser(Bzl), N^α-Boc-Thr(Bzl),

30 N^α-Boc-Tyr(2,6-Cl₂-Bzl) og N^α-Boc-Arg(Tos).

EKSEMPEL 1

Fremstilling af Boc-Arg(Tos)-benzhydrylamin-harpiks

40,44 g BHA-harpiks, (0,5 mmol/g, 20,22 mmol) blev koblet med 34,6 g Boc-Arg-(Tos)-OH (80,7 mmol) i 250 ml 25%'s DMF-CH₂Cl₂ med 16,78 g DCC (81,4 mmol) i 2 timer efterfulgt af tilsætning af 1%'s diisopropylethylamin og omsætning i yderligere 0,5 time. Den resulterende Boc-Arg(Tos)-BHA-harpiks blev vasket med 3 x 250 ml CH₂Cl₂, 3 x 250 ml MeOH, 3 x 250 ml CH₂Cl₂ og tørret. Koblings- og vaskeprocedurerne blev gentaget, og en portion blev hydrolyseret (1 ml 6M propionsyre/HCl ved 130°C i 2 timer). Aminosyreanalyse viste en substitution af 0,35 mmol Arg pr. gram harpiks. De resterende aminogrupeer blev acetyleret med Ac₂O-pyridin. Udbytte: 48,88 g.

EKSEMPEL 2

Fremstilling af [Ala¹⁵]-hGRF(1-29)-BHA-harpiks

15 15,0 g Boc-Arg(Tos)-BHA-harpiks (5,25 mmol) som fremstillet i eksempel 1 blev anbragt i reaktionsbeholderen af en Vega 250 Peptide Synthesizer, og fastfasesyntese blev udført ved den symmetriske anhydridprocedure i ialt 6 cykler, hvilket gav 21,74 g hGRF(23-29)-BHA-harpiks. En portion på 2,5 g (0,60 mmol) blev fjernet og underkastet yderligere 10 cykler fastfasesyntese, hvilket gav 2,61 g hGRF(13-29)-BHA-harpiks. En portion på 1,3 g (0,30 mmol) blev underkastet fastfasesyntese i de resterende 12 cykler. Ved afslutningen af syntesen blev Boc-gruppen på den N-terminale aminosyrerest fjernet (TFA), og peptid-harpiksen, [Ala¹⁵]hGRF(1-29)-BHA-harpiks, blev tørret, hvilket gav 1,66 g.

EKSEMPEL 3

Fremstilling, oprensning og karakterisering af $[\text{Ala}^{15}]\text{hGRF}(1-29)\text{-NH}_2$

Den i eksempel 2 fremstillede $[\text{Ala}^{15}]\text{hGRF}(1-29)\text{-BHA-harpiks}$ (1,66 g) blev behandlet med vandfrit flydende HF under anvendelse af de af Tam
 5 et al., *Tetrahedron Lett.* 23, 1982, s. 2939-2942, beskrevne modificerede betingelser, 10%'s p-cresol, 65%'s dimethylsulfid og 25%'s HF (total volumen: 20 ml) ved 0°C i 1 time og indampet. Dette blev efterfulgt af en anden reaktion med 10%'s p-cresol og 90%'s HF (total
 10 volumen: 20 ml) ved 0°C i 2 timer. HF blev indampet ved 0°C, og den rå peptid- og harpiksblanding blev tritureret med EtOAc, ekstraheret med TFA og indampet, og remanensen blev tritureret med ether og tørret. Råmaterialet (1,01 g) blev opløst i 10 ml vand (indeholdende 0,5% TFA), filtreret (0,45 μ type HA Millipore-filter) og anbragt på en Whatman Partisil M-20 ODS-3-søjle (2 x 50 cm). Søjlen blev elueret
 15 (6 ml/min.) med et opløsningsmiddelsystem bestående af CH_3CN (indeholdende 0,25% TFA) og vand (indeholdende 0,5% TFA) i en lineær gradientmetode fra 10 til 32% CH_3CN i 120 minutter og holdt ved 32% i yderligere 60 minutter. Søjlen blev derefter elueret med en lineær gradient fra 32% CH_3CN (0,25% TFA)- H_2O (0,5% TFA) til 38% CH_3CN
 20 (0,25% TFA)- H_2O (0,5% TFA) i 90 minutter. Flowhastigheden blev holdt ved 6 ml/min., fraktioner blev indsamlet (2 min./fraktion), og prøver blev analyseret ved analytisk HPLC. Produktet kom frem i fraktioner 136-140 (252-270 min), hvilke fraktioner blev kombineret, indampet og lyofiliseret, hvilket gav rent $[\text{Ala}^{15}]\text{GRF}(1-29)\text{-NH}_2$, udbytte: 71,3
 25 mg (7,05%). Fraktioner før og efter det centrale skæringspunkt blev kombineret, indampet og lyofiliseret, hvilket gav 53 mg halvrent produkt, som ikke blev oparbejdet yderligere.

Produktet viste sig at være homogent ved analytisk HPLC og højspændings-tyndtlagselektrophorese ($R_{\text{Arg}} = 0,33$). Tryptisk peptidkortlægning med analytisk HPLC svarede til kortlægningen af $\text{GRF}(1-29)\text{-NH}_2$
 30 med en smule forskellige retentionstider for de tryptiske fragmenter, der omfattede resterne 12-20 og 13-20 som forventet. Aminosyreanalyse (6N HCl indeholdende 1% thioglycolsyre, 110°C, 24 timer): Asp, 3,30; Thr, 1,07; Ser, 2,85; Glu, 2,10; Ala, 3,82; Val, 0,90; Met, 0,98;
 35 Ile, 1,87; Leu, 4,11; Tyr, 1,97;; Phe, 0,90; Lys, 2,02; Arg, 3,12.

EKSEMPEL 4

Fremstilling af [Ala^{12,15}]hGRF(1-29)-BHA-harpiks

Den i eksempel 1 fremstillede Boc-Arg(Tos)-BHA-harpiks (5 g, 1,75 mmol) blev underkastet 4 cykler af fastfasepeptidsyntese (som i eksempel 2), hvilket gav 6,1 g beskyttet hGRF(25-29)-BHA-harpiks. En portion på 2 g blev fjernet og underkastet yderligere 24 cykler fastfasesyntese. Boc-gruppen på den N-terminale aminosyrerest blev fjernet (TFA), og den sidekæde-beskyttede peptidharpiks [Ala^{12,15}]-hGRF(1-29)-BHA-harpiks blev tørret, hvilket gav 2,34 g.

10 EKSEMPEL 5

Fremstilling, oprensning og karakterisering af [Ala^{12,15}]hGRF-(1-29)-NH₂

Den i eksempel 4 fremstillede [Ala^{12,15}]hGRF(1-29)-BHA-harpiks (2,34 g) blev behandlet med vandfrit flydende HF (som i eksempel 3), og der vandtes 1,15 g rå [Ala^{12,15}]hGRF(1-29)-NH₂. Råproduktet blev underkastet HPLC-oprensning (som i eksempel 3), og det ønskede produkt fremkom i fraktioner 138-141, som blev kombineret, inddampet og lyofiliseret; udbytte: 56 mg [Ala^{12,15}]hGRF(1-29)-NH₂, der viste sig at være homogen ved analytisk HPLC. Aminosyresammensætning (hydrolyse i 6N HCl-thioglycolsyre, 110°C, 24 timer): Asp, 3,18; Thr, 0,99; Ser, 2,81; Glu, 2,17; Ala, 5,18; Val, 0,92; Met, 1,05; Ile, 1,92; Leu, 4,27; Tyr, 2,07; Phe, 0,92; Lys, 1,04; Arg, 3,20.

EKSEMPEL 6

Fremstilling af [Leu¹⁵]hGRF(1-29)-NH₂

25 De resterende 4,1 g hGRF(25-29)-BHA-harpiks fra eksempel 4 blev underkastet 9 cykler fastfasepeptidsyntese, hvilket gav 6,0 g (1,14 mmol) beskyttet hGRF(16-29)-BHA-harpiks. En portion (1,5 g, 0,28 mmol) blev yderligere underkastet 15 cykler fastfasesyntese, behand-

let med TFA og tørret, hvilket gav 0,98 g rå sidekæde-beskyttet
 [Leu¹⁵]hGRF(1-29)-BHA-harpiks. Efter HF-spaltning (som i eksempel 3)
 og efterfølgende oparbejdning vandtes 536 mg rå [Leu¹⁵]hGRF-
 (1-29)-NH₂. En 200 mg portion af dette materiale blev opløst i 10 ml
 5 0,025% TFA (H₂O), filtreret og anbragt på dobbelte (i serier) Syn-
 chropak-søjler (RP-P, 1 x 25 cm), og søjlerne blev elueret (2 ml/-
 min.) med et opløsningsmiddelsystem bestående af CH₃CN (indeholdende
 0,025% TFA) og vand (indeholdende 0,025% TFA) i en lineær gradient
 fra 25 til 40% CH₃CN i 120 minutter. Fraktioner (2 min/fraktion) blev
 10 indsamlet, og alikvoter analyseret i HPLC. Det ønskede produkt frem-
 kom i fraktioner 24-26, der blev kombineret, inddampet og lyofili-
 seret; udbytte: 9,9 mg. Produktet, [Leu¹⁵]hGRF(1-29)-NH₂, viste sig
 at være homogent ved analytisk HPLC. Aminosyresammensætning (hydroly-
 se i 6N HCl-TGA, 110°C, 24 timer): Asp, 3,10; Thr, 0,96; Ser, 2,82;
 15 Glu, 2,09; Ala, 3,10; Val, 0,99; Met, 1,02; Ile, 1,91; Leu, 5,19;
 Tyr, 1,93; Phe, 0,92; Lys, 1,98; Arg, 3,07.

EKSEMPEL 7

Fremstilling af [Val¹⁵]hGRF(1-29)-NH₂

Den i eksempel 6 fremstillede beskyttede hGRF(16-29)-BHA-harpiks (1,5
 20 g, 0,28 mmol) blev underkastet 15 cykler fastfasepeptidsyntese, be-
 handlet med TFA og tørret, hvilket gav 1,3 g sidekædet beskyttet
 [Val¹⁵]hGRF(1-29)-BHA-harpiks. Spaltning med vandfrit HF (som i ek-
 sempel 3) og efterfølgende oparbejdning gav 625 mg [Val¹⁵]hGRF(1-29)-
 -NH₂. En portion på 200 mg blev underkastet HPLC-oprensning (som i
 25 eksempel 6), og der vandtes 7,0 mg oprenset [Val¹⁵]hGRF(1-29)-NH₂.
 Produktet viste sig at være homogent ved analytisk HPLC. Aminosyre-
 sammensætning (hydrolyse i 6N HCl-TGA, 110°C, 24 timer): Asp, 2,99;
 Thr, 0,97; Ser, 2,78; Glu, 2,09; Ala, 3,07; Val, 1,98; Met, 0,97;
 Ile, 1,93; Leu, 4,16; Tyr, 2,02; Phe, 0,96; Lys, 1,99; Arg, 3,08.

EKSEMPEL 8

Fremstilling af [D-Ala², Ala¹⁵]hGRF(1-29)-NH₂

Den i eksempel 6 fremstillede beskyttede hGRF(16-29)-BHA-harpiks (3 g, 0,57 mmol) blev underkastet 13 cykler fastfasepeptidsyntese, 5 hvilket gav 3,6 g beskyttet [Ala¹⁵]hGRF(3-29)-BHA-harpiks. En portion på 1 g (0,16 mmol) blev underkastet 2 cykler fastfasesyntese og behandlet med TFA, hvilket gav 1,02 g [D-Ala², Ala¹⁵]hGRF(1-29)-BHA-harpiks. Spaltning fra harpiksen med vandfrit HF som beskrevet i eksempel 3 og efterfølgenden oparbejdning gav 575 mg rå [D-Ala², 10 Ala¹⁵]hGRF(1-29)-NH₂.

En portion på 200 mg blev underkastet HPLC-oprensning (som i eksempel 6), og der vandtes 18,3 mg oprenset [D-Ala², Ala¹⁵]hGRF(1-29)-NH₂. Produktet viste sig at være homogent ved analytisk HPLC. Aminosyre-sammensætning (hydrolyse i 6N HCl-TGA, 110°C, 24 timer): Asp, 3,05; 15 Thr, 0,93; Ser, 2,57; Glu, 2,04; Ala, 4,27; Val, 0,99; Met, 0,98; Ile, 1,93; Leu, 4,16; Tyr, 1,98; Phe, 0,97; Lys, 2,00; Arg, 3,08.

EKSEMPEL 9

Fremstilling af [Ala¹⁵]hGRF(1-29)-harpiks

3,0 g Boc-Arg(Tos)-harpiks (Bachem, 0,615 mmol) blev anbragt i reaktionsbeholderen på en Vega 1000 Peptide Synthesizer, og der udførtes 20 fastfasepeptidsyntese ved den symmetriske anhydridprocedure i ialt 13 cykler, hvilket gav hGRF(16-29)-harpiks (4,4 g). En portion på 1 g (0,13 mmol) blev underkastet yderligere 15 cykler fastfasesyntese. Ved afslutningen af syntesen blev Boc-gruppen på den N-terminale 25 aminosyrerest (TFA) fjernet, og peptid-harpiksen, [Ala¹⁵]hGRF(1-29)-harpiks, blev tørret, hvilket gav 1,66 g.

EKSEMPEL 10

Fremstilling, oprensning og karakterisering af [Ala¹⁵]hGRF(1-29)-OH

Den i eksempel 9 fremstillede [Ala¹⁵]hGRF(1-29)-harpiks (1,66 g) blev behandlet med vandfrit HF som i eksempel 3, og der vandtes 262 mg rå
 5 [Ala¹⁵]hGRF(1-29)-OH. Råmaterialet blev opløst i 4 ml 0,1% TFA (H₂O), filtreret og anbragt på en Nucleosil C18-søjle (1 x 50 cm). Søjlen blev elueret (3 ml/min.) med et opløsningsmiddelsystem bestående af CH₃CN (indeholdende 0,1% TFA) og vand (indeholdende 0,1% TFA) i en lineær gradient fra 20 til 40% CH₃CN i 180 minutter. Frak-
 10 tioner (2 min.) blev indsamlet og analyseret i HPLC. Det ønskede produkt fremkom i fraktion 76 og blev inddampet og lyofiliseret; udbytte: 2,4 mg [Ala¹⁵]hGRF(1-29)-OH, der viste sig at være homogent ved analytisk HPLC. Aminosyreanalyse (hydrolyse i 6N HCl-thioglycolsyre, 110°C, 24 timer og 72 timer): Asp, 2,98; Thr, 0,97; Ser, 2,88; Glu,
 15 2,15; Leu, 3,85; Tyr, 1,93; Arg, 2,95; Ala, 4,17; Val, 0,99; Met, 1,04; Ile, 1,91; Phe, 0,86; Lys, 2,02.

EKSEMPEL 11

Fremstilling af [Leu¹⁵]hGRF(1-29)-OH

En portion på 1 g hGRF(16-29)-harpiks (fra eksempel 9) blev underkastet yderligere 15 cykler fastfasesyntese som i eksempel 9. Udbytte:
 20 1,16 g sidekæde-beskyttet [Leu¹⁵]hGRF(1-29)-harpiks. Efter spaltning af vandfrit HF (som i eksempel 3) og efterfølgende oparbejdning vandtes 388 mg rå [Leu¹⁵]hGRF(1-29)-OH. Oprensning ved HPLC som i eksempel 10 gav 4,4 mg halvrent [Leu¹⁵]hGRF(1-29)-OH, der blev under-
 25 kastet yderligere oprensning som i eksempel 6. Det ønskede produkt fremkom i fraktioner 40-42; udbytte: 0,9 mg [Leu¹⁵]hGRF(1-29)-OH. Produktet viste sig at være homogent ved analytisk HPLC. Aminosyreanalyse (hydrolyse i 6N HCl-TGA, 110°C, 24 timer og 72 timer): Asp, 3,06; Thr, 0,94; Ser, 2,95; Glu, 2,11; Ala, 3,05; Val, 0,99; Met,
 30 0,94; Leu, 5,15; Tyr, 1,81; Arg, 3,02; Ile, 2,06; Phe, 0,85; Lys, 2,02.

EKSEMPEL 12

Fremstilling af [Val¹⁵]hGRF(1-29)-OH

En portion på 1 g hGRF(16-29)-harpiks (fra eksempel 9) blev underkastet yderligere 15 cykler fastfasepeptidsyntese som i eksempel 9. Udbytte: 1,30 g sidekæde-beskyttet [Val¹⁵]hGRF(1-29)-harpiks. Efter spaltning fra harpiksen med vandfrit flydende HF (som i eksempel 3) og oparbejdning vandtes 158 mg rå [Val¹⁵]hGRF(1-29)-OH. Oprensning som i eksempel 6 gav 4,6 mg halvoprenset produkt. Dette materiale blev yderligere oprenset som beskrevet i eksempel 10. Produktet, der fremkom i fraktion 78 blev inddampet og lyofiliseret; udbytte: 1,8 mg [Val¹⁵]hGRF(1-29)-OH. Produktet viste sig at være homogent ved analytisk HPLC. Aminosyreanalyse (hydrolyse i 6N HCl-TGA, 110°C, 72 timer): Asp, 2,92; Glu, 2,00; Ala, 2,91; Val, 2,03; Met, 0,98; Phe, 0,87; Lys, 2,13; Leu, 4,14; Arg, 3,08 (hydrolyse i 6N HCl-TGA, 150°C, 1 time): Ile, 1,93; Tyr, 1,91.

EKSEMPEL 13

Syntese af Boc-Leu-MBHA-harpiks

Boc-Leu-MBHA-harpiks blev fremstillet ved kobling af Boc-Leu-OH (17,68 g, 83 mmol) til 70 g methylbenzhydrylaminharpiks (0,28 mækv/g) som beskrevet i eksempel 1; udbytte: 72,87 g. Aminosyreanalyse viste en substitution af 0,23 mmol/g-harpiks.

EKSEMPEL 14

Fremstilling af [Ala¹⁵]hGRF(1-44)-MBHA-harpiks

Den i eksempel 13 fremstillede Boc-Leu-BHA-harpiks (78,87 g, 18,1 mmol) blev anbragt i reaktionsbeholderen på en Vega 296 Peptide Synthesizer, og fastfasesyntese blev udført i ialt 16 cykler, hvilket gav 37,65 g hGRF(28-44)-MBHA-harpiks. En portion på 5 g (0,75 mmol) blev fjernet og underkastet yderligere 12 cykler fastfasesyntese,

hvilket gav 5,15 g hGRF(28-44)-MBHA-harpiks. En portion på 1,7 g af dette materiale blev underkastet yderligere 15 cykler fastfasesyntese. Ved afslutningen af syntesen blev Boc-gruppen på den N-terminale aminosyrerest fjernet (TFA), og peptidharpiksen, [Ala¹⁵]hGRF-

5 (1-44)-MBHA-harpiks, blev tørret, hvilket gav 1,73 g.

EKSEMPEL 15

Fremstilling af [Ala¹⁵]hGRF(1-44)-NH₂

Den i eksempel 14 fremstillede [Ala¹⁵]hGRF(1-44)-MBHA-harpiks (0,85 g) blev behandlet med vandfrit flydende HF som beskrevet i eksempel

10 3; udbytte: 380 mg rå [Ala¹⁵]hGRF(1-44)-NH₂. En portion på 190 mg blev underkastet oprensning som beskrevet i eksempel 6 (lineær gradient 15-35%). Det ønskede produkt fremkom i fraktioner 42-43, der blev kombineret, indampet og lyofiliseret; udbytte: 10,5 mg [Ala¹⁵]hGRF(1-44)-NH₂. Produktet viste sig at være homogent ved an-

15 alytisk HPLC. Aminosyresammensætning (hydrolyse i 6N HCl-TGA, 110°C, 24 timer og 72 timer): Asp, 4,00; Thr, 0,91; Ser, 3,69; Glu, 7,40; Gly, 2,16; Ala, 6,00; Val, 0,97; Met, 0,93; Ile, 1,85; Leu, 5,25; Tyr, 1,83; Phe, 0,85; Lys, 1,97; Arg, 6,16; Phe, 0,91.

EKSEMPEL 16

20 Syntese af [Leu¹⁵]hGRF(1-44)-NH₂

En portion på 1,79 g af den i eksempel 14 fremstillede hGRF(16-44)-MBHA-harpiks blev underkastet yderligere 15 cykler fastfasesyntese som beskrevet i eksempel 14; udbytte: 1,67 g sidekæde-beskyttet [Leu¹⁵]hGRF(1-44)-MBHA-harpiks. Halvdelen af dette materiale blev

25 behandlet med flydende vandfrit HF som beskrevet i eksempel 3; udbytte: 400 mg rå [Leu¹⁵]hGRF(1-44)-NH₂. 200 mg blev underkastet HPLC-oprensning som beskrevet i eksempel 6 og 15. Det ønskede produkt fremkom i fraktioner 43 og 44, der blev kombineret, indampet og lyofiliseret; udbytte: 11,0 mg [Leu¹⁵]hGRF(1-44)-NH₂. Produktet viste

30 sig at være homogent ved analytisk HPLC. Aminosyresammensætning

(hydrolyse i 6N HCl-TGA, 110°C, 24 timer og 72 timer): Asp, 3,89; Thr, 0,93; Ser, 3,67; Glu, 7,40; Gly, 2,15; Ala, 5,00; Val, 0,95; Met, 0,98; Phe, 1,02.

EKSEMPEL 17

5 Fremstilling af [Ala¹⁵]GRF(1-38)-BHA-harpiks

Den i eksempel 1 fremstillede Boc-Arg(Tos)-BHA-harpiks kan anbringes i reaktionsbeholderen på en Vega 250 Peptide Synthesizer, og fastfasesyntese kan udføres ved den symmetriske anhydridprocedure i ialt 16 cykler, hvilket giver GRF(22-38)-BHA-harpiks. En portion kan
10 fjernes og underkastes yderligere 6 cykler fastfasesyntese, hvilket giver GRF(16-38)-BHA-harpiks. En portion kan derefter omdannes ved fastfasesyntese i de resterende 15 cykler. Ved afslutningen af syntesen kan Boc-gruppen på den N-terminale aminosyrerest fjernes under anvendelse af TFA, og den vundne [Ala¹⁵]GRF(1-38)-BHA-harpiks kan
15 tørres.

EKSEMPEL 18

Fremstilling, oprensning og karakterisering af [Ala¹⁵]GRF(1-38)-NH₂

Den i eksempel 17 fremstillede [Ala¹⁵]GRF(1-38)-BHA-harpiks kan behandles med vandfrit flydende HF som beskrevet i eksempel 3. En portion kan derefter underkastes oprensning som i eksempel 6 (lineær
20 gradient 15-35%). De fraktioner, som indeholder det ønskede produkt, kombineres, inddampes og lyofiliseres. Produktet kan derefter bedømmes for homogenitet ved analytisk HPLC og bekræftes ved aminosyreanalyse.

EKSEMPEL 19

Syntese af [Leu¹⁵]GRF(1-38)-NH₂

En portion af den i eksempel 17 fremstillede GRF(16-38)-BHA-harpiks kan underkastes yderligere 15 cykler fastfasesyntese som i eksempel 5 17, hvilket giver beskyttet [Leu¹⁵]GRF(1-38)-BHA-harpiks. En portion af dette materiale kan behandles med vandfrit flydende HF som i eksempel 3, hvorved fås rå [Leu¹⁵]GRF(1-38)-NH₂. En portion af dette rå produkt kan derefter underkastes HPLC-oprensning som i eksempel 6 og 15. Fraktionerne, som indeholder det ønskede produkt, kan kombineres, inddampes og lyofiliseres. Produktet kan påvises at være homogent ved analytisk HPLC og bekræftes ved aminosyreanalyse.

EKSEMPEL 20

Syntese af [Ala¹⁵, Leu²⁷]GRF(1-29)-NH₂

Den i eksempel 1 fremstillede Boc-Arg(Tos)-BHA-harpiks kan anbringes i reaktionsbeholderen på en Vega 250 Peptide Synthesizer, og fastfasesyntese kan udføres ved den symmetriske anhydridprocedure i ialt 15 2 cykler, hvilket giver GRF(28-29)-BHA-harpiks. En portion kan fjernes og kobles med Boc-Leu og derefter underkastes yderligere 10 cykler fastfasesyntese, hvorved fås [Leu²⁷]GRF(16-29)-BHA-harpiks. En 20 portion kan derefter fjernes, kobles med Boc-Ala og underkastes de yderligere 14 cykler fastfasesyntese som beskrevet i eksempel 3.

EKSEMPEL 21

Fremstilling af [β -Ala¹⁵]hGRF(1-29)-NH₂

En portion på 1,68 g hGRF(16-29)BHA-harpiks (0,30 mmol) fra eksempel 25 6 blev underkastet 15 cykler fastfasepeptidsyntese, behandlet med TFA og tørret, hvilket gav 1,93 g sidekæde-beskyttet [β -Ala¹⁵]hGRF(1-29)-BHA-harpiks. Den beskyttede peptidharpiks blev underkastet spaltning med vandfrit HF som i eksempel 3, og efter den sædvanlige oparbejd-

- ning vandtes 1,2 g rått $[\beta\text{-Ala}^{15}]\text{hGRF}(1\text{-}29)\text{-NH}_2$. En portion på 200 mg (0,05 mmol) blev underkastet HPLC-oprensning som i eksempel 6, og der vandtes 35,5 mg $[\beta\text{-Ala}^{15}]\text{hGRF}(1\text{-}29)\text{-NH}_2$. Produktet viste sig at være homogent ved analytisk HPLC. Aminosyresammensætning (hydrolyse i 6N HCl-TGA, 150°C, 1 time): Asp, 3,13; Thr, 0,98; Ser, 2,95; Glu, 2,14; Ala, 3,13; Met, 1,01; Tyr, 2,03; Lys, 1,99, (hydrolyse i 6N HCl-TGA, 110°C, 24 timer): Val, 1,09; Phe, 1,10; $\beta\text{-Ala}$, 0,87; Arg, 2,94.

EKSEMPEL 22

Fremstilling af $[\text{desNH}_2\text{-Tyr}^1]\text{hGRF}(1\text{-}29)\text{-NH}_2$

- Den i eksempel 8 fremstillede hGRF(3-29)-BHA-harpiks (1,0 g, 0,13 mmol) blev underkastet 2 cykler fastfasepeptidsyntese, hvilket gav 1,26 g $[\text{desNH}_2\text{-Tyr}^1]\text{hGRF}(1\text{-}29)\text{-BHA-harpiks}$. Spaltning fra harpiksen med HF som i eksempel 3 gav 0,79 g rått $[\text{desNH}_2\text{-Tyr}^1]\text{hGRF}(1\text{-}29)\text{-NH}_2$. En portion på 120 mg deraf blev underkastet HPLC-oprensning som i eksempel 6, hvilket gav 19,5 mg $[\text{desNH}_2\text{-Tyr}^1]\text{hGRF}(1\text{-}29)\text{-NH}_2$. Produktet viste sig at være homogent ved analytisk HPLC. Aminosyreanalyse (hydrolyse i 6N HCl-TGA, 110°C, 24 timer): Asp, 3,08; Thr, 0,98; Ser, 2,94; Glu, 2,13; Gly, 1,10; Ala, 3,31; Val, 1,01; Met, 1,01; Ile, 1,97; Leu, 4,29; Tyr, 1,04; Phe, 0,98; Lys, 1,99; Arg, 3,15.

EKSEMPEL 23

Fremstilling af $[\text{desNH}_2\text{-Tyr}^1, \text{D-Ala}^2, \text{Ala}^{15}]\text{hGRF}(1\text{-}29)\text{-NH}_2$

- En portion af den i eksempel 6 fremstillede hGRF(16-29)-BHA-harpiks (3,23 g, 0,58 mmol) blev underkastet 13 cykler fastfasepeptidsyntese, behandlet med TFA og tørret, hvilket gav $[\text{Ala}^{15}]\text{hGRF}(3\text{-}29)\text{-BHA-harpiks}$. En portion på 1,798 g af den beskyttede peptidharpiks blev underkastet 2 cykler fastfasepeptidsyntese, hvor der successivt blev tilføjet D-Ala og 3-(4-hydroxyphenyl)propionat. Den beskyttede peptidharpiks (1,85 g) blev behandlet med HF som i eksempel 3, og råproduktet blev tørret, hvilket gav 0,827 g. En portion på 200 mg blev underkastet HPLC-oprensning som i eksempel 6, hvilket gav 22,2 mg

[desNH₂-Tyr¹, D-Ala², Ala¹⁵]hGRF(1-29)-NH₂; udbytte: 9%. Produktet var homogent ved analytisk HPLC. Aminosyresammensætning (hydrolyse i 6N HCl-TGA, 110°C, 24 timer og 72 timer): Thr, 1,02; Ser, 2,798; Tyr, 1,00; Lys, 2,04; Arg, 3,13; Asp, 2,80; Glu, 2,10; Ala, 3,98; Val, 1,04; Met, 1,03; Ile, 1,85; Phe, 0,92.

EKSEMPEL 24

Fremstilling af [desNH₂-Tyr¹, Ala¹⁵]hGRF(1-29)-NH₂

En portion på 1,8 g [Ala¹⁵]hGRF(1-29)BHA-harpiks fra eksempel 2 blev underkastet 2 cykler peptidsyntese som beskrevet i eksempel 2. Den beskyttede peptidharpiks blev spaltet med HF som beskrevet i eksempel 3, hvilket gav 0,79 g råpeptid. En portion på 200 mg blev underkastet HPLC-oprensning som beskrevet i eksempel 6, hvilket gav 13 mg (5% udbytte) [desNH₂-Tyr¹, Ala¹⁵]hGRF(1-29)-NH₂. Produktet viste sig at være homogent ved analytisk HPLC. Aminosyresammensætning (hydrolyse i 6N HCl-TGA, 150°C, 1 time og 72 timer): Asp, 3,00; Thr, 1,00; Ser, 3,00; Tyr, 0,99; Lys, 1,99; Arg, 3,04; Glu, 2,05; Ala, 4,25; Val, 0,99; Met, 0,92; Ile, 1,85; Leu, 3,97; Phe, 0,94.

EKSEMPEL 25

Fremstilling af [α -Aib¹⁵]hGRF(1-29)-NH₂

En portion på 1,68 g hGRF(16-29)BHA-harpiks (0,30 mmol) fra eksempel 6 blev underkastet 15 cykler fastfasepeptidsyntese, behandlet med TFA og tørret, hvilket gav 1,93 g sidekæde-beskyttet [α -Aib¹⁵]hGRF(1-29)-BHA-harpiks. Den beskyttede peptidharpiks blev underkastet spaltning med vandfrit HF som i eksempel 3, og efter den sædvanlige oparbejdning vandtes råt [α -Aib¹⁵]hGRF(1-29)-NH₂. En portion på 200 mg blev underkastet HPLC-oprensning som i eksempel 6, og der vandtes [α -Aib]-hGRF(1-29)-NH₂. Produktet viste sig at være homogent ved analytisk HPLC.

EKSEMPEL 26

- Den biologiske aktivitet af de her omhandlede forbindelser blev sammenlignet med den biologiske aktivitet af syntetisk GRF(1-44)-NH₂. Den biologiske aktivitet af den syntetiske GRF(1-44)-NH₂ var identisk med aktiviteten af naturligt GRF(1-44)-NH₂, der blev isoleret fra en human pancreastumor af et individ, der led af acromegali [Salk Institute standard hGRF-NH₂-(NL-A-10)]. Assayet for biologisk aktivitet, der er baseret på evnen til at stimulere dannelsen af væksthormon i rottehypofyseceller i vævskultur, blev udført på følgende måde:
- 10 Hypofyser fra 30-40 Sprague-Dawley-hanrotter (175 g) blev fjernet aseptisk efter dekapitering. Forlapperne blev indsamlet, vasket 3 gange i steril Hepes-puffer (0,025M, pH 7,35) og dispergeret ved 37°C i 20-30 ml Hepes-puffer (pH 7,35) indeholdende collagenase (4 mg pr. ml) og Dispase (protease kvalitet II, 2 mg pr. ml). Efter nansom vortexering i 100-110 minutter og triturering ved hjælp af en Pasteur-pipette, blev de dispergerede celler adskilt ved centrifugering (150 x g, 4 min) og resuspenderet i Hepes-puffer indeholdende neuraminidase (8 g/ml) og 200 g/ml ethylendiamintetraeddikesyre (EDTA)-dinatriumsalt, pH 7,35, i 10 minutter. Cellerne blev vasket 2 gange med udpladningsmedium og udpladet på multibrønd-plader (1,5 x 10⁵ celler pr. ml) under anvendelse af nedenstående definerede medium: F-12/-DMEM/BGJ (6:3:1, Gibco: 430-1700/430-1600/320-2591) med 2 g BSA/l, 2,38 g Hepes/l, 50 mg PSN antibiotikablanding (Gibco Laboratories), 10 mg/l transferrin (Sigma T2252) med 1,83 mg NaHCO₃/l (Baker 3506).
 - 25 Mediet i hver brønd blev tilsat enten en prøve af den hidtil ukendte GRF-analog eller naturligt GRF(1-44)-NH₂ i koncentrationer i området 0,8-200 fmol pr. ml medium. Kontrolbrønde indeholdt ikke nogen tilsætning. Udpladningen blev udført med dette medium, hvortil der var sat 2% føtalt kalveserum, for at sikre hurtig fastgørelse af cellerne. På 4. dagen blev cellerne vasket 2 gange med det definerede medium uden føtalt kalveserum. Endelig blev 900 µl defineret medium sat til hver brønd plus 100 µl af samme medium, der indeholdt hver individuel behandling in triplo. Efter 4 timers inkubation blev mediet indsamlet og fortyndet efter behov til udførelse af radioimmunoassay (RIA) for rottevæksthormon. RIA for rottevæksthormon blev udført under anvendelse af Sinha's antimurine GH-immunserum og Natio-

nal Pituitary Agency's metode under anvendelse af protein A til udfældning af antistof/antigenkompleks.

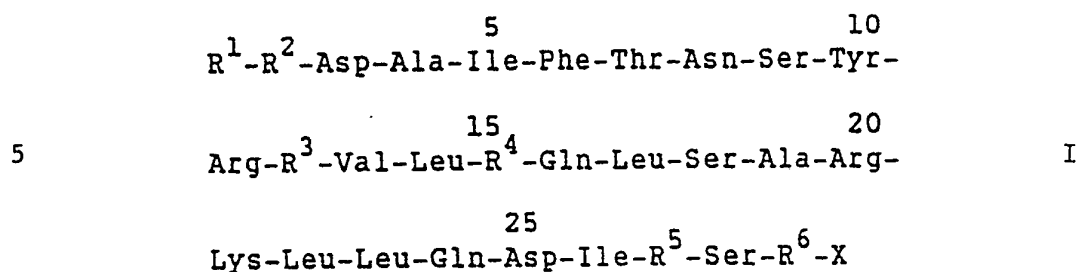
Resultaterne af assayene var, at det hidtil ukendte (Ala¹⁵)GRF(1-29)-NH₂ blev sammenlignet med GRF(1-29)NH₂ og viste sig at være 5,1 gange 5
stærkere. De relative potenser i forhold til GRF(1-44)NH₂ er vist i
nedenstående tabel.

TABEL

Forbindelse nr.	Relative potens
1) GRF (1-44)NH ₂	1.0
2) [Ala ¹⁵]GRF(1-29)OH	1.5,
3) [Val ¹⁵]GRF(1-29)NH ₂	1.08
4) [Leu ¹⁵] GRF(1-29)NH ₂	3.5
5) [Ala ¹⁵] GRF(1-29)NH ₂	3.81
6) [β-Ala ¹⁵] GRF(1-29)NH ₂	5.56
7) [Aib ¹⁵]GRF(1-29)NH ₂	3.7
8) [Ala ¹² ,Ala ¹⁵]GRF(1-29)NH ₂	2.6
9) [desNH ₂ Tyr ¹ ,Ala ¹⁵]GRF(1-29)NH ₂	4.04
10) [desNH ₂ Tyr ¹ ,Ala ¹⁵ ,Met ²⁷]GRF(1-29)NH ₂	0.83
11) [desNH ₂ Tyr ¹ ,D-Ala ² ,Ala ¹⁵]GRF(1-29)NH ₂	4.70
12) [desNH ₂ Tyr ¹ ,D-Ala ² ,Ala ¹⁵ ,Met ²⁷]GRF(1-29)NH ₂	0.63
13) [Ala ¹⁵ ,Nle ²⁷]GRF(1-29)NH ₂	4.27
14) [D-Ala ² ,Ala ¹⁵ ,Nle ²⁷]GRF(1-29)NH ₂	1.47
15) [N-Me-D-Ala ² ,Ala ¹⁵ ,Nle ²⁷]GRF(1-29)NH ₂	3.08
16) [desNH ₂ Tyr ¹ ,D-Ala ² ,Ala ¹⁵ ,Nle ²⁷]GRF(1-29)NH ₂	3.06
17) [desNH ₂ Tyr ¹ ,N-Me-D-Ala ² ,Ala ¹⁵ ,Nle ²⁷]GRF(1-29)NH ₂	1.82
18) [Leu ¹⁵]GRF(1-29)OH	0.65
19) [Val ¹⁵]GRF(1-29)OH	0.38
20) [D-Ala ² ,Ala ¹⁵]GRF(1-29)NH ₂	4.86

PATENTKRAV

1. Væksthormonfrigivende faktor (GRF)-forbindelse med den almene formel I

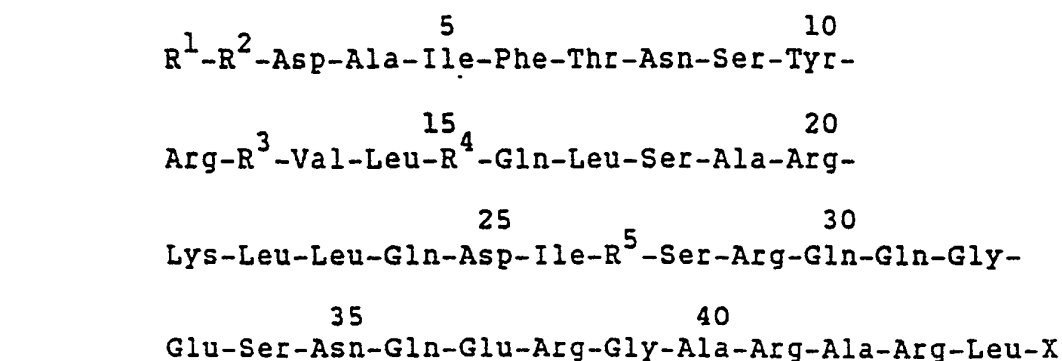


hvor R^1 betegner Tyr, D-Tyr, desNH₂-Tyr, Ac-Tyr eller His; R^2 betegner Ala, D-Ala eller N-methyl-D-Ala; R^3 betegner Lys eller Ala; R^4 betegner Ala, Leu, Val, Ile, Nle, Nval, β -Ala eller α -Aminoisosmørsyre; R^5 betegner Met, Leu, Nle eller Ile; R^6 betegner en aminosyresekvens valgt blandt Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Ser-Asn-Gln-Glu-Arg-Gly-Ala-Arg-Ala-Arg-Leu og fragmenter deraf, hvor sekvensen er reduceret i antal med 1-15 aminosyrerester fra carboxylenden; og X betegner enten OH eller NH₂, og hvor alle aminosyrer er L-aminosyrer medmindre andet specifikt er angivet.

eller farmaceutisk acceptable syre- eller baseadditionssalte deraf.

2. Forbindelse ifølge krav 1,

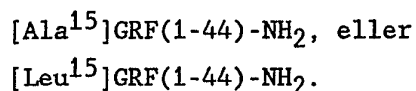
kendetegnet ved, at den har den almene formel



20

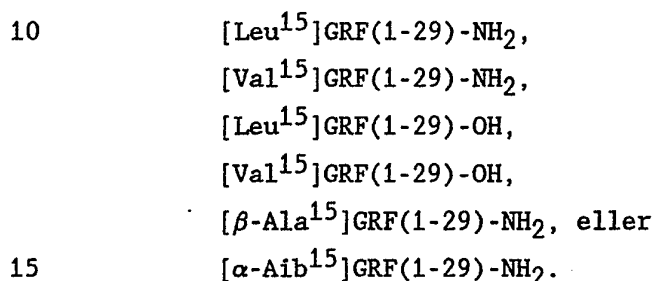
hvor R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 og X har den i krav 1 anførte betydning.

3. Forbindelse ifølge krav 2,
k e n d e t e g n e t ved, at den er



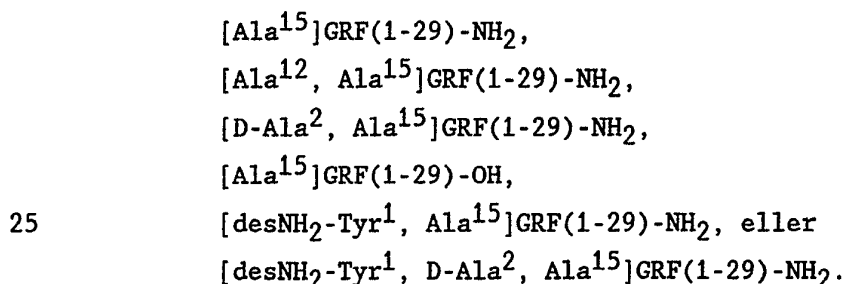
5 4. Forbindelse ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at R^6 betegner Arg, og R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5
og X har den i krav 1 anførte betydning.

5. Forbindelse ifølge krav 4,
k e n d e t e g n e t ved, at den er



6. Forbindelse ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at R^4 betegner Ala, og R^1 , R^2 , R^3 , R^5 , R^6
og X har den i krav 1 anførte betydning.

7. Forbindelse ifølge krav 6,
20 k e n d e t e g n e t ved, at den er



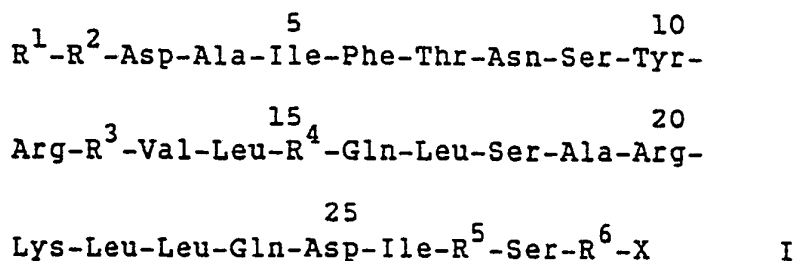
8. Forbindelse ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at R^4 betegner Ala, R^5 betegner Leu, R^6
30 betegner Arg, og R^1 , R^2 , R^3 og X har den i krav 1 anførte betydning.

9. Forbindelse ifølge et hvilket som helst af kravene 1-8 til anvendelse som terapeutikum, især til behandling af vækstrelaterede lidelser, som er karakteriserede ved væksthormondeficienser hos mennesker.

- 5 10. Forbindelse ifølge et hvilket som helst af kravene 1-8, k e n d e t e g n e t ved, at den anvendes til behandling af dyr for at fremme deres vækst.

11. Fremgangsmåde til fremstilling af væksthormonfrigivende faktor (GRF)-forbindelser med den almene formel I

10



- 15 hvor R^1 betegner Tyr, D-Tyr, desNH₂-Tyr, Ac-Tyr eller His; R^2 betegner Ala, D-Ala eller N-methyl-D-Ala; R^3 betegner Lys eller Ala; R^4 betegner Ala, Leu, Val, Ile, Nle, Nval, β -Ala eller α -Aminoisosmørsyre; R^5 betegner Met, Leu, Nle eller Ile; R^6 betegner en aminosyresekvens valgt blandt Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Ser-Asn-Gln-Glu-Arg-Gly-Ala-Arg-Ala-Arg-Leu og fragmenter deraf, hvor sekvensen er reduceret i antal med 1-15 aminosyrerester fra carboxylenden; og X betegner enten OH eller NH₂, og hvor alle
- 20 aminosyrer er L-aminosyrer medmindre andet specifikt er angivet,

eller farmaceutisk acceptable syre- eller baseadditionssalte deraf, k e n d e t e g n e t ved, at

- a) beskyttelsesgrupperne på et hensigtsmæssigt beskyttet polypeptid med en tilsvarende aminosyresekvens, hvilket polypeptid er syntetiseret ved opløsningsfasepeptidsyntese, fraspaltes under anvendelse af sædvanlige metoder, eller
- 25

b) et hensigtsmæssigt sidekæde-beskyttet harpiksbundet polypeptid med tilvarende aminosyresekvens, hvilket polypeptid er blevet syntetiseret ved fastfasepeptidsyntese, omsættes med vandfrit flydende HF,

og den vundne forbindelse med den almene formel I om ønsket omdannes
5 til et farmaceutisk acceptabel syre- eller baseadditionssalt.

12. Farmaceutisk præparat,

k e n d e t e g n e t ved, at det indeholder en effektiv mængde af en forbindelse ifølge et hvilket som helst af kravene 1-8 og en ikke-toxisk farmaceutisk acceptabel flydende eller fast bærer.

10 13. Anvendelse af en forbindelse ifølge et hvilket som helst af kravene 1-8 til fremstilling af et terapeutisk præparat til behandling af vækstrelaterede lidelser, der er karakteriserede ved væksthormon-deficienser hos mennesker, eller til behandling af dyr for at fremme deres vækst.