

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY 143 842

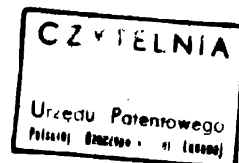
Patent dodatkowy
do patentu —

Zgłoszono: 84 01 21 /P. 245687/

Pierwszeństwo: 83 04 26 Stany
Zjednoczone
Ameryki

Zgłoszenie ogłoszono: 86 08 26

Opis patentowy opublikowano: 89 06 30



Int. Cl.⁴ C07K 7/10

Twórca wynalazku —

Uprawniony z patentu: The Salk Institute For Biological Studies, La Jolla
/Stany Zjednoczone Ameryki/

SPOSÓB WYTWARZANIA NOWYCH BIOLOGICZNIE CZYNNYCH PEPTYDÓW

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania peptydów wywierających wpływ na działanie przysadki mózgowej u ludzi i zwierząt, w szczególności ssaków. W szczególności przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania peptydu, który pobudza uwalnianie hormonu wzrostu przez przysadkę mózgową.

Fizjologom od dawna wiadomo, że podwzgórze kontroluje całą czynność wydzielniczą gruczołowej części przysadki w ten sposób, że podwzgórze wytwarza specjalne polipeptydy, które wywołują wydzielanie każdego hormonu przysadki. Zidentyfikowano także czynnik hamujący, który hamuje wydzielanie hormonu wzrostu /GH - skrót od angielskiego terminu growth hormone/ i znany jest jako somatostatyna.

Z wyciągu z występującego u ludzi nowotworu trzustki został ostatnio wyodrębniony, oczyszczony, zidentyfikowany, zsyntetyzowany i przebadany odpowiadający podwzgórzowy czynnik wywołujący wydzielanie przysadkowego GH. Kolejność aminokwasów w tym peptydzie jest następująca: 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. Amidowana postać tego peptydu określana jest w niniejszym opisie jako hpGRF /skrót od angielskiego terminu human pancreatic tumor GH releasing factor, co oznacza czynnik wywołujący wydzielanie GH nowotworu trzustki u ludzi/.

Obecnie z wyciągów z podwzgórza szczurów został wyodrębniony, oczyszczony, zidentyfikowany, zsyntetyzowany i przebadany peptyd, który uwalnia GH z wyhodowanych komórek przysadkowych. Kolejność aminokwasów w tym zawierającym 43 reszty, występującym w przyrodzie peptydzie jest następująca: H-His-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Ser-Ser-Tyr-Arg-Arg-Ile-Leu-Gly-Gln-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-His-Glu-Ile-Met-Asn-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-Arg-Ser-Arg-Phe-Asn-OH. Peptyd ten jest dalej w opisie określany jako rhGRF

/skrót od angielskiego terminu rat hypothalamic GH releasing factor, co oznacza szczurzy, podwzgórzowy czynnik wyzwalający wydzielanie GH/.

Obecnie zsyntetyzowano i przebadano pewne analogi hpGRF, działające silniej niż sam hpGRF, przy czym wiele z tych analogów ma krótszy łańcuch. Niektóre z tych analogów bazują na podstawieniach zgodnych ze wzorem rhGRF, podczas gdy inne bazują na innych podstawieniach. Kompozycje farmaceutyczne zawierające peptydy wytwarzane sposobem według wynalazku zawierają te analogi hpGRF lub ich nietoksyczne sole, zdyspergowane w farmaceutycznie dopuszczalnym nośniku ciekłym lub stałym. Takie kompozycje farmaceutyczne można stosować w leczeniu klinicznym, tak w odniesieniu od ludzi jak i weterynaryjnym, zarówno do podawania w celach leczniczych, jak i w celach diagnostycznych. Ponadto można je stosować dla pobudzania wzrostu zwierząt ciepłokrwistych, włącznie z drobiem i w gospodarce wodnej dla zwierząt zimnokrwistych, np. ryb, węgorzy itd.

Dla określenia peptydu przyjęto nomenklaturę, jaką podali Schroder i Lubke w publikacji "The Peptides", Academic Press /1965/, w której zgodnie z konwencjonalnym przedstawianiem grupa aminowa na końcowym atomie N znajduje się po lewej stronie, podczas gdy grupa karboksylowa na końcowym atomie C znajduje się po prawej stronie. Przez naturalny aminokwas rozumie się jeden z pospolitych, występujących w przyrodzie aminokwasów występujących w białkach, takich jak Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, Thr, Lys, Arg, Asp, Asn, Glu, Gln, Cys, Met, Phe, Tyr, Pro, Trp i His. W przypadku, gdy reszta aminokwasu posiada odmiany izomeryczne, to występuje odmiana L aminokwasu, jeśli nie stwierdzono wyraźnie inaczej. Dla celów niniejszego opisu rhGRF uważa się za analog hpGRF.

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania peptydów o wzorze 1: $H-R_1-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-R_8-Ser-R_{10}-Arg-R_{12}-R_{13}-Leu-R_{15}-Gln-Leu-R_{18}-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-R_{24}-R_{25}-Ile-R_{27}-R_{28}-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-R_{34}-Asn-Gln-Glu-R_{38}-R_{39}-R_{40}-Arg-R_{42}-R_{43}-R_{44}-Y$, w którym R_1 oznacza Tyr, Met, D-Tyr, Phe, D-Phe, Leu, D-His lub His; R_8 oznacza Ser lub Asn; R_{10} oznacza Tyr, Phe lub D-Tyr; R_{12} oznacza Arg lub Lys; R_{13} oznacza Ile lub Val; R_{15} oznacza Gly lub D-Ala; R_{18} oznacza Tyr lub Ser; R_{24} oznacza His lub Gln; R_{25} oznacza Glu lub Asp; R_{27} wybrany jest z grupy obejmującej izomery D i L, Ala, Nle, Ile, Leu, i Val; R_{28} oznacza Ser, Asn lub D-Ala; R_{34} oznacza Arg lub Ser; R_{38} oznacza Gln lub Arg; R_{39} oznacza Arg lub Gly; R_{40} oznacza Ser lub Ala; R_{42} oznacza Phe lub Ala; R_{43} oznacza Asn lub Arg; R_{44} oznacza resztę naturalnego aminokwasu lub des- R_{44} , Y oznacza grupę $-COOH$ lub $-CONH_2$ lub o długości łańcucha od R_1 do co najmniej R_{27} , który polega na tym, że aminokwasy, w których przynajmniej grupy α -aminowe są zabezpieczone, sprzęga się ze sobą w kolejności określonej wzorem 1 w łańcuch o długości od R_1 do co najmniej R_{27} , metodą syntezy na fazie stałej stosując 1 do 2 milimoli zabezpieczonego aminokwasu na 1 g żywicy, w rozpuszczalniku, korzystnie w chlorku metylenu lub dimetyloformamidzie lub w ich mieszaninie, po czym z wytworzonego peptydu zawierającego co najmniej jedną grupę zabezpieczającą, o wzorze 2: X^1-R_1/X lub $X^2/-Ala-Asp/X^3/-Ala-Ile-Phe-Thr/X^4/-R_8/X^4$ lub $X^5/-Ser/X^4/-R_{10}/X^2/-Arg/X^6/-R_{12}/-X^6$ lub $X^7/-R_{13}-Leu-R_{15}-Gln/X^5/-Leu-R_{18}/X^2/-Ala-Arg/X^6/-Lys-/X^7/-Leu-Leu-R_{24}/X$ lub $X^5/-R_{25}/X^3/-Ile-R_{27}-R_{28}/X^4$ lub $X^5/-Arg/X^6/-Gln/X^5/-Gln/X^5/-Gly-Glu/X^3/-R_{34}/X^4$ lub $X^6/-Asn/X^5/-Gln/X^5/-Glu/X^3/-R_{38}/X^5$ lub $X^6/-R_{39}/X^6/-R_{40}/X^4/-Arg/X^6/-R_{42}-R_{43}/X^3$ lub $X^6/-R_{44}/X^8/-X^9$, w którym X^1 oznacza atom wodoru lub grupę zabezpieczającą grupę α -aminową, korzystnie BOC, X oznacza atom wodoru lub grupę zabezpieczającą azot imidazolu w His, korzystnie Tos, X^2 oznacza atom wodoru lub grupę zabezpieczającą fenolową grupę hydroksylową Tyr, korzystnie grupę 2,6-dichlorobenzylową, X^3 oznacza atom wodoru lub grupę zabezpieczającą grupę karboksylową Asp lub Glu, korzystnie Bzl, X^4 oznacza atom wodoru lub grupę zabezpieczającą alkoholową grupę hydroksylową Thr lub Ser, korzystnie grupę Bzl, X^5 oznacza atom wodoru lub grupę zabezpieczającą amidową grupę bocznego łańcucha Asn lub Gln, korzystnie grupę Xan, X^6 oznacza atom wodoru lub grupę zabezpieczającą grupę guanidynową Arg, korzystnie Tos, X^7 oznacza atom wodoru lub grupę zabezpieczającą grupę aminową bocznego łańcucha Lys, korzystnie grupę 2-chlorobenzylotykarbonylową, X^8 oznacza atom wodoru lub grupę zabezpieczającą bocznym łańcuch jak określono powyżej, X^9 oznacza $-O-CH_2$ -nośnik polimerowy lub $-NH$ -nośnik

polimerowy, a $R_1, R_8, R_{10}, R_{12}, R_{13}, R_{15}, R_{18}, R_{24}, R_{25}, R_{27}, R_{28}, R_{34}, R_{38}, R_{39}, R_{40}, R_{42}, R_{43}$ i R_{44} mają wyżej podane znaczenie lub z peptydu o długości łańcucha od R_1 do co najmniej R_{27} usuwa się grupy zabezpieczające i odszczepia się peptyd zawierający co najmniej 27 reszt aminokwasów od nośnika polimerowego przy użyciu kwasu trójfluorooctowego w rozpuszczalniku, korzystnie CH_2Cl_2 , a następnie fluorowodoru ze zmiataczem, korzystnie anizolem lub sulfidem metylowo-etylowym lub ich mieszaniną, w niskiej temperaturze, korzystnie około $0^{\circ}C$ -do- $20^{\circ}C$, po czym rozpuszcza się w rozpuszczalniku, korzystnie w kwasie octowym i oczyszcza się znanym sposobem.

Peptydy wytwarzane sposobem według wynalazku, zarówno zawierające 44 aminokwasy jak i ich fragmenty, wykazują czynność biologiczną i ogólnie przyjmuje się, że peptyd powinien rozciągać się co najmniej od końcowego atomu N poprzez resztę 27. Kiedy fragment peptydu rozciąga się tylko do reszty 27 i 28, wówczas jako Y korzystnie występuje grupa NH_2 lub podstawiona grupa amidowa, natomiast gdy fragment peptydu rozciąga się do jednej z reszt od 29 do 39, Y korzystnie stanowi grupa amidowa lub podstawiona grupa amidowa.

Analogi hpGRF zawierające jeden z wymienionych aminokwasów zamiast Met w pozycji 27, wykazują znacznie wyższą stabilność, zwłaszcza w przypadku wystawienia na warunki utleniające; ponadto jeśli podstawnikiem jest izomer D, może uzyskać podniesienie odporności na działanie enzymów. Pozostają one w pełni biologicznie czynne i niektóre analogi wykazują zadziwiająco zwiększoną czynność w toku badań *in vitro*. Bardzo wysoką aktywność wykazują peptydy zawierające His w pozycji 1. Ponadto izomer D aminokwasu, np. D-tyr, zapewnia wyjątkowo wysoką aktywność oraz nadaje peptydom odporność na działanie niektórych enzymów.

Syntezę peptydów przeprowadza się różnymi sposobami, takimi jak techniki wykorzystujące wyłącznie fazę stałą, techniki wykorzystujące częściowo fazę stałą, przez kondensację fragmentów, przez klasyczne sprzęganie w roztworze lub też z zastosowaniem ostatnio opracowanych technik z rekombinowanym DNA. Techniki syntezy wyłącznie w fazie stałej omówione są na przykład w książce "Solid-Phase Peptide Synthesis", Stewart i Young Freeman and Co., San Francisco, 1969 i przedstawione na przykładach ujawnionych w opisie patentowym Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 4 105 603. Sposób syntezy wykorzystujący kondensację fragmentów ujawniono w opisie patentowym Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 3 972 859, zaś inne znane sposoby syntezy ujawniono w opisach patentowych Stanów Zjednoczonych Ameryki nr nr 3 842 067 i 3 862 925.

Syntezę z zastosowaniem technik z rekombinantem DNA dla celów niniejszego opisu należy rozumieć jako właściwe wykorzystanie kodowania genów strukturalnych dla uzyskania pożądanej postaci analogu hpGRF lub jego fragmentu. Syntetyczny peptyd hpGRF można uzyskać w wyniku transformacji mikroorganizmu z zastosowaniem przenośnika ekspresji zawierającego promotor i operator wraz z takim genem strukturalnym i spowodowania, że tak przekształcony mikroorganizm wydzieli peptyd hpGRF. Również zwierzęta można wykorzystywać do wytwarzania peptydu hpGRF poprzez hodowlę genetyczną z zastosowaniem takiego genu strukturalnego i ogólnych technik ujawnionych w opisie patentowym Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 4 276 282, względnie wykorzystywania mikroiniekcji zarodków jak to opisano w WO83/01783 opublikowanym w dniu 26 maja 1983 i WO82/04443 opublikowanym w dniu 23 grudnia 1982. Syntetyczny peptyd hpGRF można także wytwarzać bezpośrednio w zwierzęciu, którego wzrost pragnie się przyspieszyć, wykorzystując techniki opisane w tych dwu publikacjach WO.

Elementem wspólnym dla syntez chemicznych jest zabezpieczenie nietrwałych grup w łańcuchach bocznych różnych reszt aminokwasów za pomocą odpowiednich grup zabezpieczających, które będą zapobiegały zajściu reakcji chemicznej w tym miejscu, aż do ostatecznego usunięcia tej grupy. Zwykle także wspólne jest zabezpieczenie ω -aminowej grupy aminokwasu lub fragmentu peptydu, gdy w reakcję z następnym aminokwasem wchodzi grupa karboksylowa, po czym selektywnie usuwa się grupę zabezpieczającą grupę aminową w położeniu ω , dla umożliwienia przeprowadzenia dalszej reakcji w tym miejscu. Również wspólnym elementem jest wy-

tworzenie w syntezie związku pośredniego, który zawiera każdą z reszt aminokwasów umieszczoną w pożądanej kolejności w łańcuchu peptydu, z grupami zabezpieczającymi łańcuchy boczne związanymi z odpowiednimi resztami.

Grupy zabezpieczające grupę aminową w położeniu α , objęte symbolem X^1 , są dobrze znane ze swej przydatności w stopniowej syntezie polipeptydów. Do klasy grup zabezpieczających grupę aminową w położeniu α , które można zastosować jako X^1 należą: /1/ grupy zabezpieczające typu aromatycznych uretanów, takie jak fluorofenylometyloksykarbonylowa /Fmoc/, benzyloksykarbonylowa /Z/ i podstawiona Z, taka jak p-chlorobenzyloksykarbonylowa, p-nitrobenzyloksykarbonylowa, p-bromobenzyloksykarbonylowa i p-metoksybenzyloksykarbonylowa; /2/ grupy zabezpieczające typu alifatycznych uretanów, takie jak III rz.-butyloksykarbonylowa /BOC/, diizopropylometyloksykarbonylowa, izopropylometyloksykarbonylowa, etoksykarbonylowa, allyloksykarbonylowa; oraz

/3/ grupy zabezpieczające typu uretanów cykloalkilowych, takie jak cyklopentylometyloksykarbonylowa, adamantyloksykarbonylowa, oraz cykloheksyloksykarbonylowa. Korzystną grupą zabezpieczającą grupę aminową w położeniu alfa jest grupa III rz.-butyloksykarbonylowa /BOC/.

X oznacza atom wodoru lub grupę zabezpieczającą dla azotu imidazolu w His, taką jak Tos.

X^2 może być odpowiednią grupą zabezpieczającą dla fenolowej grupy hydroksylowej Tyr, taką jak grupa tetrahydropiranylowa, III rz.-butylowa, tritylowa, Bzl, CBZ, 4Br-CBZ i 2,6-dichlorobenzylowa /DCB/. Korzystną grupą zabezpieczającą jest grupa 2,6-dichlorobenzylowa. Jako X^2 może występować atom wodoru, co oznacza, że w tym położeniu na reszcie aminokwasu nie występuje boczny łańcuch grupy zabezpieczającej.

X^3 oznacza atom wodoru lub też odpowiednia, tworząca ester grupa zabezpieczająca dla grupy karboksylowej Asp lub Glu, taka jak grupa benzylowa /OBzl/, 2,6-dichlorobenzylowa, metylowa i etylowa.

X^4 może być odpowiednią grupą zabezpieczającą dla alkoholowej grupy hydroksylowej Thr lub Ser, taką jak grupa acetylowa, benzylowa, III rz.-butylowa, tritylowa, tetrahydropiranylowa, Bzl, 2-6-dichlorobenzylowa i CBZ. Korzystną grupą zabezpieczającą jest Bzl. Jako X^4 może występować atom wodoru, co oznacza, że na grupie hydroksylowej nie występuje grupa zabezpieczająca.

X^5 oznacza atom wodoru lub odpowiednią grupę zabezpieczającą boczną grupę aminową Asn lub Gln. Korzystnie jest to grupa ksantylowa /Xan/.

X^6 oznacza odpowiednią grupę zabezpieczającą dla grupy guanidynowej Arg, taką jak grupa nitrowa, TOS, CBZ, adamantyloksykarbonylowa i BOC lub oznacza atom wodoru.

X^7 oznacza atom wodoru lub odpowiednią grupę zabezpieczającą dla bocznej grupy aminowej Lys. Przykładami odpowiednich grup zabezpieczających boczną grupę aminową są grupa 2-chlorobenzyloksykarbonylowa /2-Cl-Z/, Tos, III rz.-amylometyloksykarbonylowa i BOC.

X^8 oznacza atom wodoru lub odpowiednią grupę zabezpieczającą łańcuch boczny, jak to ogólnie określono powyżej.

Met można ewentualnie zabezpieczyć tlenem, ale korzystnie pozostawia się ją bez zabezpieczenia.

Wybór grupy zabezpieczającej boczną grupę aminową nie jest krytyczny, z tym zastrzeżeniem, że zwykle wybiera się taką grupę, która nie zostanie usunięta podczas usuwania zabezpieczenia grupy aminowej w położeniu alfa w trakcie syntezy. Jednakże dla niektórych aminokwasów, np. His, po zakończeniu sprzęgania zabezpieczenie zwykle nie jest konieczne i wówczas grupy zabezpieczające mogą być takie same.

X⁹ oznacza odpowiednią grupę zabezpieczającą dla grupy karboksylowej końcowego atomu C, taką jak tworząca ester grupa X³ lub wiązanie łączące stosowane w syntezie na fazie stałej, wiążące z nośnikiem w postaci stałej żywicy, względnie des-X⁹, w którym to przypadku reszta na końcowym atomie C zawiera Y, która stanowi grupa karboksylowa, jak to określono powyżej.

W sposobie według wynalazku jako nośnik można stosować dowolną stałą żywicę znaną w technice, np. nośnik o wzorze żywica-CH₂-O-, -NH-żywica benzhydrioloaminowa /BHA/ lub -NH-żywica parametylobenzhydrioloaminowa /MBHA/. W przypadku, kiedy pożądane jest uzyskanie niepodstawionego amidu, korzystne jest stosowanie żywicy BHA lub MBHA, ponieważ rozszczepienie bezpośrednio daje amid. W przypadku, kiedy pożądane jest otrzymanie N-metyloamidu, można stosować żywicę N-metylo-BHA. W przypadkach, gdy pożądane jest otrzymanie innych podstawionych amidów, korzystne można okazać się przeprowadzenie syntezy peptydu z zastosowaniem metod klasycznych, takich jak podane w publikacji Houben-Weyla.

We wzorze związku pośredniego co najmniej jedna z grup X jest grupą zabezpieczającą.

Przy dokonywaniu wyboru konkretnej grupy zabezpieczającej łańcuch boczny, która ma być wykorzystana w trakcie syntezy peptydów, przestrzega się następujących zasad: a/ grupa zabezpieczająca musi zachowywać swoje właściwości zabezpieczające i nie ulegać odszczepieniu w warunkach sprzęgania, b/ grupa zabezpieczająca musi być stabilna w warunkach działania reagentu i za wyjątkiem grupy Xan, powinna być stabilna w warunkach reakcji dobranych dla usuwania grupy zabezpieczającej grupę aminową w położeniu alfa na każdym etapie syntezy oraz c/ grupa zabezpieczająca łańcuch boczny musi dawać usuwać się, po zakończeniu syntezy peptydu zawierającego pożądaną kolejność aminokwasów, w warunkach reakcji, które nie będą powodowały zmiany łańcucha peptydu.

Sposobem według wynalazku peptydy wytwarza się wykorzystując syntezę na fazie stałej, jak to ogólnie opisał Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85, s. 2149/1963/, jakkolwiek można także stosować inne, znane w technice równoważne syntezę chemiczną, jak to wspomniano powyżej. Syntezę na fazie stałej zaczyna się od tej strony peptydu, gdzie znajduje się końcowy atom C, przez sprzęgnięcie zabezpieczonego α-aminokwasu z odpowiednią żywicą. Taki materiał wyjściowy można przygotować przez przyłączenie α-aminokwasu z zabezpieczoną grupą aminową wiązaniem estrowym do chlorometylowanej żywicy lub hydroksymetylowej żywicy, albo też wiązaniem amidowym do żywicy BHA lub żywicy MBHA. Jeśli w wynikowym polipeptydzie ma występować grupa metylo-, etylo- lub propyloamidowa, to stosuje się żywicę chlorometylowaną lub hydroksymetylową i rozszczepienie przeprowadza się za pomocą odpowiedniej aminy, np. etyloaminy.

Tak więc na przykład przy wytwarzaniu zawierającego 40 reszt aminokwasów peptydu, Ala zabezpieczone przy pomocy BOC sprzęga się z chlorometylowaną żywicą w sposób, jaki opisali Monahan i Gilon, Biopolymer 12, s. 2513-19, 1973. Po sprzęgnięciu BOC-Ala z nośnikiem w postaci żywicy, usuwa się grupę zabezpieczającą grupę aminową w położeniu alfa, np. za pomocą kwasu trifluorooctowego /TFA/ w chlorku metylenu, samego TFA albo HCl w dioksanie. Usuwanie zabezpieczenia przeprowadza się zwykle w temperaturze pomiędzy około 0°C a temperaturą pokojową. Do usuwania konkretnych grup zabezpieczających grupę aminową w położeniu alfa można także wykorzystywać inne standardowe odczynniki i warunki odszczepiania, jak to opisano w książce Schroder i Lubke "The Peptides", 1 str. 72-75 /Academic Press 1965/.

Po usunięciu grupy zabezpieczającej grupę aminową w położeniu alfa Phe, pozostałe aminokwasy z zabezpieczonymi grupami aminowymi w położeniu alfa i łańcuchami bocznymi sprzęga się stopniowo w żądanej kolejności w celu uzyskania określonego powyżej związku pośredniego, przy czym każdy aminokwas można wprowadzać oddzielnie do syntezy bądź sprzęgać je wzajemnie ze sobą przed wprowadzeniem do reaktora z fazą stałą. Dobór odpowiedniego odczynnika sprzęgającego zależy od doświadczenia. Szczególnie dobrym odczynnikiem do sprzęgania jest N,N'-dicykloheksylokarbodiimid /DCCI/.

Środki aktywujące stosowane w syntezie peptydów na fazie stałej są dobrze znane w technice peptydów. Przykładami odpowiednich odczynników aktywujących są karbodiimidy, takie jak N,N'-diizopropylkarbodiimid oraz N-etylo-N'-/3-dimetyloaminopropyl-/karbodiimid. Inne odczynniki aktywujące oraz ich zastosowanie do sprzęgania peptydów opisali Schroder i Lubke, w/w książka, rozdz. III oraz Kappor w J.Pharm.Sci., 59, str. 1-27 /1970/.

Każdy zabezpieczony aminokwas lub sekwencję aminokwasów wprowadza się do reaktora z fazą stałą w czterokrotnym lub większym nadmiarze, a sprzęganie przeprowadza się w środowisku składającym się z mieszaniny dimetyloformamidu /DMF/ i CH_2Cl_2 /1:1/, względnie w samym DMF lub CH_2Cl_2 . W przypadku, gdy sprzęganie nie przebiega do końca, procedurę sprzęgania powtarza się przed usunięciem grupy zabezpieczającej grupę aminową w położeniu alfa przeprowadzanym przed sprzęganiem następnego aminokwasu.

Prowadzenie reakcji sprzęgania na każdym etapie syntezy sprawdza się reakcją ninhydrynową, jak to opisali E.Kaiser i in., Anal. Biochem. 34, 595 /1970/. Reakcję sprzęgania można przeprowadzać automatycznie, w automatycznym syntetyzatorze model Beckman 990, wykorzystując program taki jak opisali Rivier i inn. Biopolymers 1978, 17, str. 1927-1938.

Po zakończeniu pożądanej sekwencji aminokwasów, pośredni peptyd usuwa się z nośnika w postaci żywicy przez działanie odczynnikiem takim jak ciekły fluorowódor, który nie tylko odszczepia peptyd od żywicy, ale zarazem odszczepia wszystkie pozostałe grupy zabezpieczające łańcuchy boczne, a więc grupy X , X^2 , X^3 , X^4 , X^5 , X^6 , X^7 i X^8 , wiązanie łączące X^9 i grupę zabezpieczającą grupę aminową w położeniu alfa, w wyniku czego otrzymuje się peptyd w postaci wolnego kwasu. Jeśli w łańcuchu występuje Met, wówczas korzystnie usuwa się najpierw grupę zabezpieczającą BOC stosując mieszaninę kwasu trifluorooctowego /TFA/ i etanoditiolu, jeszcze przed odszczepieniem peptydu od żywicy za pomocą HF, aby wyeliminować potencjalne S-alkilowanie. W przypadku stosowania do odszczepiania fluorowodoru, do naczynia reakcyjnego wprowadza się anizol i siarkowodór metylo-etylowy celem zmiatania wolnych rodników.

W jednym ze sposobów wytwarzania syntetycznych peptydów z zastosowaniem techniki z rekombinowanym DNA, korzystnie wprowadza się resztę Met jako dodatkową resztę na końcowym atomie azotu i Met nie powinna występować poza tym nigdzie indziej w peptydzie. Podobnie wszystkie reszty użyte w peptydzie muszą być naturalnymi izomerami L aminokwasów lub Gly. W wyniku tego wytwarza się korzystny pośredni peptyd o wzorze: H-Met- R_1 -Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr- R_8 -Ser-Tyr-Arg- R_{12} - R_{13} -Leu-Gly-Gln-Leu- R_{18} -Ala-Arg-Lys-Leu-Leu- R_{24} - R_{25} -Ile- R_{27} - R_{28} -Arg-Gln-Gln-Gly-Glu- R_{34} -Asn-Gln-Glu- R_{38} - R_{39} - R_{40} -Arg- R_{42} - R_{43} - R_{44} -Y, w którym R_1 oznacza Tyr, Leu lub His, R_8 oznacza Ser lub Asn, R_{12} oznacza Arg lub Lys, R_{13} oznacza Ile lub Val, R_{18} oznacza Tyr lub Ser, R_{24} oznacza His lub Gln, R_{25} oznacza Glu lub Asp, R_{27} oznacza Ala, Nle, Ile, Leu lub Val, R_{28} oznacza Asn lub Ser, R_{34} oznacza Arg lub Ser, R_{38} oznacza Gln lub Arg, R_{39} oznacza Arg lub Gly, R_{40} oznacza Ser lub Ala, R_{42} oznacza Phe lub Ala, R_{43} oznacza Asn lub Arg, R_{44} oznacza naturalny aminokwas lub des- R_{44} , zaś Y oznacza część karboksylową reszty C-końcowego aminokwasu i oznacza -COOH lub -CONH₂.

Po wydzieleniu tego peptydu przez genetycznie zmodyfikowany mikroorganizm i wyodrębnieniu oraz oczyszczeniu znanymi sposobami, na związek pośredni działa się bromowodorem i odszczepia się resztę Met na końcowym atomie N otrzymując biologicznie czynny peptyd. Jakkolwiek podany powyżej wzór wskazuje, że peptyd ten rozciąga się aż do pozycji 43 lub nawet pozycji 44, to, jak już stwierdzono powyżej, znaczną czynność biologiczną wykazują już nawet peptydy zawierające tylko 27 do 29 reszt.

Syntetyczne peptydy wytworzone sposobem według wynalazku porównywano z oczyszczonym syntetycznym hpGRF/1-40/-OH oraz z oczyszczonym syntetycznym hpGRF/1-40/Phe-Gln-NH₂, w toku badań in vitro, w celu określenia ich skuteczności w pobudzaniu do wydzielania hormonu wzrostu. Wszystkie te syntetyczne analogi wykazują znaczną aktywność w wywoływaniu wydzielania GH.

Badania in vitro przeprowadzano stosując syntetyczny hpGRF jako wzorzec i porównywano z różnymi zsyntetyzowanymi analogami w równomolowych stężeniach. Stosowano w tym celu hodowle zawierające komórki przysadki mózgowej szczurów, pobrane na cztery do pięciu dni wcześniej. Do badań porównawczych stosowano hodowle uważane za optymalne w wydzielaniu hormonu wzrostu, postępując zgodnie ze sposobem, jaki opisali Vale i in., Endocrinology, 91, 562-572 /1972/. Przez 3 do 4 godzin prowadzi się inkubację z badaną substancją, a następnie pobiera się próbki pożywki hodowli i przetwarza celem oznaczenia zawartości dającego odczyn odpornościowy GH /ir GH = immunoreactive GH/, z zastosowaniem dobrze znanej techniki oznaczeń radioimmunologicznych.

Wyniki tych porównawczych badań z zastosowaniem równomolowych stężeń podano poniżej w tabeli 1:

T a b e l a 1

Peptyd	Badania in vitro Względna moc działania *
[Nle ²⁷] -hpGRF/1-32/-NH ₂	3,21 /2,02 - 5,43/
[His ¹] -hpGRF/1-32/-NH ₂	2,15 /1,12 - 4,41/
[Ile ²⁷] -hpGRF/1-32/-OH	0,20 /0,11 - 0,35/
[D-Tyr ¹] -hpGRF/1-32/-NH ₂	0,74 /0,47 - 1,14/
[Phe ¹] -hpGRF/1-32/-NH ₂	0,13 /0,05 - 0,29/
[Phe ¹⁰] -hpGRF/1-32/-NH ₂	0,69 /0,26 - 2,63/
[Val ²⁷] -hpGRF/1-32/-OH	0,31 /0,21 - 0,45/
[His ¹ , Nle ²⁷] -hpGRF/1-32/-NH ₂	3,22 /2,12 - 5,33/

* oznaczana względem hpGRF/1-40/-Phe-Gln-NH₂

Badania in vitro tych syntetycznych peptydów wykazują, że EC₅₀ waha się w zakresie 20-100 pikomoli, zaś najniższe skuteczne stężenie wynosi 3-8 pikomoli. Maksymalne skuteczne stężenie hpGRF/1-40/-NH₂ wynosiło 1 nM.

Wyniki tych badań porównawczych dla równomolowych stężeń różnych analogów hpGRF bazujących na rhGRF przedstawiono w tabeli 2.

T a b e l a 2

Peptyd	Porównanie, %
hpGRF/1-40/-OH	
/wzorzec dla tego badania/	100%
rhGRF/1-43/-OH	300%
rhGRF/1-29/-NH ₂	1100%
[D-Tyr ¹⁰] -rhGRF/1-29/-NH ₂	34%
[D-Tyr ^{1,10}] -rhGRF/1-29/-NH ₂	600%
[Tyr ¹⁷] -rhGRF/1-29/-NH ₂	920%
[Nle ²⁷] -rhGRF/1-32/-NH ₂	1390%
[Leu ¹ , Nle ²⁷] -rhGRF/1-29/-NH ₂	480%
[D-His ¹ , D-Tyr ¹⁰ , D-Ala ¹⁵] -rhGRF/1-29/-NH ₂	29%
rhGRF- [Val ⁴⁴ -NH ₂]	670%

Badania in vitro tych syntetycznych peptydów wykazują, że EC₅₀ waha się w zakresie 20-100 pikomoli, zaś najniższe skuteczne stężenie wynosi 3-8 pikomoli. Maksymalne skuteczne stężenie rhGRF/1-43/-OH wynosiło 1 nM.

Oprócz tych badań wydzielania hormonu wzrostu in vitro, przeprowadzono również badania in vitro, wstrzykując syntetyczny peptyd poprzez cewnik założony na stałe swobodnie poruszającym się szczurom-samcom. Zwierzętom podano "przednio FLA-63, inhibitor hydroksylazy dopaminy, który tłumi spontaniczne wydzielanie GH, bez wpływania na reakcję na zewnętrzny GRF.

Próbki krwi pobierano przez ten sam cewnik bezpośrednio przed oraz po upływie 5 i 20 minut po wstrzyknięciach; poziomy GH we krwi mierzy się przez oznaczenia radioimmunologiczne. Wyniki wykazują, że syntetyczne analogi hpGRF są potężnymi stymulatorami wydzielania przysadkowego GH. Stwierdzono, że skutecznie działają dawki w zakresie od około 20 µg do około 25 µg na kg wagi ciała.

Dalsze badania wykazują, że znaczną czynność wykazują również inne syntetyczne analogi hpGRF wytwarzane sposobem według wynalazku i z tych badań można wyciągnąć pewne ogólne wnioski:

1. Amidowanie końcowego atomu C nie wydaje się zwiększać aktywności peptydów GRF o długości łańcucha powyżej 39 reszt, natomiast zwiększa aktywność peptydów o długości mniejszej niż 39 reszt. Tak więc na przykład $[Ile^{27}]$ -hpGRF/1-32/-NH₂ wykazuje większą czynność niż $[Ile^{27}]$ -hpGRF/1-32/-OH; $[D-Tyr^1, Nle^{27}]$ -hpGRF/1-32/-NH₂ wykazuje wyższą czynność niż $[D-Tyr^1, Nle^{27}]$ -hpGRF/1-32/-OH; zaś $[Ile^{27}]$ -hpGRF/1-29/-NH₂ wykazuje wyższą czynność niż $[Ile^{27}]$ -hpGRF/1-29/-OH. Natomiast $[Ile^{27}]$ -hpGRF/1-44/-NH₂ wykazuje taką samą czynność jak $[Ile^{27}]$ -hpGRF/1-44/-OH.

2. W szeregu amidowanych peptydów analogi o 32 resztach są zasadniczo równie czynne jak odpowiadające dłuższe analogi, na przykład $[Nle^{27}]$ -hpGRF/1-32/-NH₂ wykazuje w przybliżeniu tę samą czynność co $[Nle^{27}]$ -hpGRF/1-44/-NH₂.

3. W szeregu peptydów z wolną końcową grupą karboksylową, odpowiadające analogi posiadające więcej niż 39 reszt wykazują jednakową czynność. Tak więc na przykład $[Val^{27}]$ -hpGRF/1-40/-OH i $[Val^{27}]$ -hpGRF/1-44/-OH wykazują jednakową czynność, podobnie jak $[D-Tyr^1, Nle^{27}]$ -hpGRF/1-40/-OH oraz $[D-Tyr^1, Nle^{27}]$ -hpGRF/1-44/-OH.

Syntetyczne analogi hpGRF powinny być przydatne w zastosowaniach, w których lekarz pragnie zwiększyć wytwarzanie GH. Pobudzenie wydzielania GH przez analogi hpGRF jest pożądane w przypadku pacjentów, u których występuje całkowity lub też względny niedobór GH spowodowany przez niedostateczne wytwarzanie endogennego GRF. Jest ponadto rzeczą prawdopodobną, że zwiększone wydzielanie GH i towarzyszące temu zwiększenie wzrostu można byłoby osiągnąć także u ludzi i zwierząt z normalnymi poziomami GH. Ponadto podawanie hpGRF mogłoby zmienić ilość tłuszczu w organizmie i zmodyfikować także inne, uzależnione od GH procesy metaboliczne, immunologiczne i rozwojowe.

Tak więc na przykład analogi hpGRF mogą być użyteczne jako środki stymulujące procesy anaboliczne u ludzi w takich stanach, jak po przebytych oparzeniach. W innym przypadku analogi hpGRF można podawać zwierzętom hodowlanym, takim jak kurczaki, indyki, świny, kozy, owce i bydło, w celu przyspieszenia wzrostu i podniesienia uzyskiwanego stosunku białka do tłuszczu. Można je także stosować w gospodarce wodnej do hodowli ryb oraz innych morskich zwierząt zimnokrwistych, np. żółwi morskich i węgorzy oraz zwierząt ziemnowodnych. Dla podawania ludziom syntetyczne analogi hpGRF powinny mieć czystość co najmniej około 93% i korzystnie co najmniej 98%. Czystość taka oznacza, że żądany peptyd występuje w ilości odpowiadającej % wagowym pośród wszystkich obecnych podobnych peptydów i fragmentów peptydów.

Dla podawania syntetycznych analogów hpGRF zwierzętom hodowlanym lub też innym zwierzętom dla pobudzenia ich wzrostu i zmniejszenia zawartości tłuszczu, dopuszczalna może być czystość nawet około 5%, lub też nawet tak niska jak 0,001%. W przypadku wytwarzania metodami inżynierii genetycznej analogi te mogą początkowo mieć bardzo niską czystość.

Syntetyczne analogi hpGRF lub też ich nietoksyczne sole, w połączeniu z farmaceutycznie lub weterynaryjnie dopuszczalnym nośnikiem tworzące kompozycję farmaceutyczną, można podawać ludziom i zwierzętom doustnie, podskórnie, domięśniowo, przez nos lub doustnie. Podawanie może być wykorzystywane przez lekarza w celu pobudzenia wydzielania GH wówczas, gdy leczony organizm wymaga takiego sposobu leczenia. Pożądane dawkowanie będzie uzależnione od konkretnego leczzonego stanu, surowości przebiegu tego stanu i czasu trwania przewidywanego leczenia.

Peptydy takie często podaje się w postaci farmaceutycznie lub weterynaryjnie dopuszczalnej soli, takiej jak sole addycyjne z kwasami lub związki kompleksowe z metalami, np. z cynkiem, żelazem lub podobnym pierwiastkiem /które dla celów niniejszego opisu uważa się za sole/. Przykładem takich soli addycyjnych z kwasami są chlorowodorek, bromowodorek, siarczan, fosforan, maleinian, octan, cytrynian, benzoesan, bursztynian, jabłczan, askorbinian, winian itp. Jeśli składnik czynny ma być podawany doustnie w postaci tabletki, wówczas tabletkę może zawierać środek wiążący, taki jak tragakanta, skrobia kukurydziana lub żelatyna; środek dezintegrujący, taki jak kwas alginowy; oraz środek smarny, taki jak stearynian magnezu. Jeśli pożądane jest podawanie w ciekłej postaci, wówczas można stosować środki słodzące i/lub porawiające smak; można także stosować podawanie dożylnie w soli fizjologicznej, roztworach buforów fosforanowych i podobnych roztworach.

Peptydy należy podawać ludziom pod kontrolą lekarza i kompozycje farmaceutyczne będą zwykle zawierały peptyd w połączeniu z konwencjonalnym, farmaceutycznie dopuszczalnym nośnikiem. Zwykle dawka pozajelitowa będzie wynosić od około 20 µg do około 25 µg peptydu na kg wagi ciała organizmu.

W podanych poniżej przykładach przedstawiono korzystny sposób przeprowadzenia syntezy analogów hpGRF z zastosowaniem techniki reakcji na fazie stałej.

P r z y k ł a d I. Syntezę $[Ile^{27}]$ -hpGRF/1-40/-NH₂ o wzorze: H-Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Ile-Ser-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Ser-Asn-Gln-Glu-Arg-Gly-Ala-NH₂ przeprowadza się stopniowo, wykorzystując syntetyzator peptydów model Beckman 990, na przeprowadzonej w chlorowodorek żywicy MBHA, takiej jak dostarczana przez firmę Bachem, Inc., posiadająca zakres podstawienia do około 0,1 do 0,5 mmoli/g żywicy. Sprzęganie BOC-Ala z żywicą przeprowadza się wykorzystując ogólny sposób opisany poniżej w Harmonogramach A i B, który wykorzystuje się w trakcie całej syntezy i który daje w wyniku podstawienie około 0,35 mmola Ala na gram żywicy. Wszystkie stosowane rozpuszczalniki starannie odgazowuje się, przedmuchując je gazem obojętnym, np. helem lub azotem, aby zapewnić nieobecność tlenu, którym mógłby utleniać siarkę z reszty Met.

Po odblokowaniu i zobojętnieniu, na żywicy buduje się stopniowo łańcuch peptydu. Odblokowanie, zobojętnianie i dodawanie każdego aminokwasu przeprowadza się ogólnie biorąc zgodnie z procedurą przedstawioną szczegółowo w opisie patentowym Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 4 292 313.

Odblokowanie korzystnie przeprowadza się według przedstawionego poniżej Harmonogramu A:

Harmonogram A	
Odczynnik	Czas mieszania /min/
1. 60%TFA /2% etanoditiol	10
2. 60% TFA /2% etanoditiol	15
3. IPA /1% etanoditiol	0,5
4. Et ₃ N /10%/ w CH ₂ Cl ₂	0,5
5. MeOH	0,5
6. Et ₃ N /10%/ w CH ₂ Cl ₂	0,5
7. MeOH /dwukrotnie/	0,5
8. CH ₂ Cl ₂ /dwukrotnie/	0,5

Operacje sprzęgania korzystnie przeprowadza się zgodnie z przedstawionym poniżej Harmonogramem B:

Harmonogram B	
Odczynnik	Czas mieszania /min/
9. DCCI	-
10. BOC - aminokwas	50-90
11. MeOH /dwukrotnie/	0,5

12. CH_2Cl_2 /dwukrotnie/	0,5
13. Ac_2O /3M/ w CH_2Cl_2	15,0
14. CH Cl	0,5
15. MeOH	0,5
16. CH_2Cl_2 /dwukrotnie/	0,5

W skrócie jeden do dwu mmoli zabezpieczonego BOC aminokwasu w chlorku metylenu stosuje się na gram żywicy, plus jeden równoważnik 1,0 M DCCI w chlorku metylenu na 2 godziny. Podczas sprzęgania BOC-Arg/Tos/ stosuje się mieszaninę 50% DMF i chlorku metylenu. Jako grupę zabezpieczającą hydroksylowy łańcuch boczny Ser i Thr stosuje się eter Bzl. Do aktywowania karboksylowego końca Asn lub Gln stosuje się ester p-nitrofenylowy /ONp/ i na przykład BOC-Asn/ONp/ sprzęga się przez noc, stosując jeden równoważnik HOBt w 50% mieszaninie DMF i chlorku metylenu, w którym to przypadku nie dodaje się już DCC. W przypadku stosowania sprzęgania DCC zamiast wykorzystywania aktywnego estru, grupę amidową Asn lub Gln zabezpiecza się Xan. Jako grupę zabezpieczającą dla bocznego łańcucha Lys stosuje się grupę 2-chlorobenzylotlenokarbonylową /2-Cl-Z/.

Dla zabezpieczenia guanidynowej grupy Arg stosuje się Tos, zaś karboksylową grupę Glu lub Asp zabezpiecza się jako ester Bzl /OBzl/. Fenolową grupę hydroksylową Tyr zabezpiecza się grupą 2,6-dichlorobenzylową /DCB/. Po zakończeniu syntezy otrzymuje się następujący związek: $\text{X}^1\text{-Tyr/X}^2\text{-Ala-Asp/X}^3\text{-Ala-Ile-Phe-Thr/X}^4\text{-Asn/X}^5\text{-Ser/X}^4\text{-Tyr/X}^2\text{-Arg/X}^6\text{-Lys/X}^7\text{-Val-Leu-Gly-Gln/X}^5\text{-Leu-Ser/X}^4\text{-Ala-Arg/X}^6\text{-Lys/X}^7\text{-Leu-Leu-Gln/X}^5\text{-Asp/X}^3\text{-Ile-Ile-Ser/X}^4\text{-Arg/X}^6\text{-Gln/X}^5\text{-Gln/X}^5\text{-Gly-Glu/X}^3\text{-Ser/X}^4\text{-Asn/X}^5\text{-Gln/X}^5\text{-Glu/X}^3\text{-Arg/X}^6\text{-Gly-Ala-X}^8$, w którym X^1 oznacza BOC, X^2 oznacza DCB, X^3 oznacza ester benzylowy, X^4 oznacza Bzl, X^5 oznacza Xan, X^6 oznacza Tos, X^7 oznacza 2-Cl-Z, zaś X^8 oznacza grupę -NH- żywicy nośnika. Grupa Xan może być częściowo lub całkowicie usunięta w wyniku działania TFA użytego dla odblokowania grup zabezpieczających grupy aminowe w położeniu alfa.

Po sprzęgnięciu z żywicą końcowej reszty Tyr, BOC usuwa się 60% TFA w CH_2Cl_2 . W celu odszczepienia i usunięcia grup zabezpieczających z pozostałego zabezpieczonego peptydu-żywicy, traktuje się go 1,5 ml anizolu, 0,5 ml siarczku metylowoetylowego i 15 ml fluorowodoru /HF/ na gram peptydu-żywicy, przez pół godziny w temperaturze -20°C i przez pół godziny w 0°C . Po usunięciu HF w warunkach wysokiej próżni, pozostałość peptydu-żywicy przemywa się na przemian suchym eterem etylowym i chlороformem, po czym peptyd ekstrahuje się odgazowanym 2N wodnym roztworem kwasu octowego i oddziela się od żywicy przez odsączenie.

Odszczepiony i uwolniony od grup zabezpieczających peptyd rozpuszcza się następnie w 0-5% kwasie octowym i poddaje oczyszczaniu, które może obejmować sączenie przez drobnoziarnisty żel Sephadex G-50.

Peptyd oczyszcza się następnie wykorzystując preparatywną lub semipreparatywną cieczową chromatografię ciśnieniową, jak to opisali Rivier i in., *Peptides: Structure and Biological Function*, s. 125-8 /1979/ oraz Marki i in., *J. Am. Chem. Soc.* 103, 3178 /1981/. Wkładki Waters Associates prep LC-500 napelnia się 15-20 C_{18} Silica z f-my Vydac /300A/. Przy pomocy niskociśnieniowego wytwornika gradientu Eldex wytwarza się gradient CH_3CN w TEAP, jak to opisał J. Rivier, *J. Liq. Chromatography* 1, 343-367 /1978/. Frakcje chromatograficzne kontroluje się dokładnie metodami cieczowej chromatografii ciśnieniowej i łączy się jedynie frakcje wykazujące wysoką czystość. Odsalanie oczyszczonych frakcji, badanych niezależnie celem określenia ich czystości, przeprowadza się z zastosowaniem gradientu CH CN w 0,1% TFA. Środkową frakcję poddaje się następnie liofilizacji celem otrzymania pożądanego peptydu, którego czystość jest wyższa niż 98%.

Syntezę powtarza się stosując chlorometylowaną żywicę celem wytworzenia tego samego peptydu w postaci wolnego kwasu, jak to ogólnie opisał J. Rivier, *J. Am. Chem. Soc.*, 96, 2986-2992 /1974/.

P r z y k ł a d II. Syntezę $[Val^{27}, D-Ala^{28}]$ -hpGRF/1-40/-NH₂ o wzorze: 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-Val-D-Ala-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Ser-Asn-Gln-Glu-Arg-Gly-Ala-NH₂ przeprowadza się stopniowo, wykorzystując syntetyzator peptydów model Beckman 990, na żywicy MBHA w sposób opisany w przykładzie I. Wykorzystując chromatografię cienkowarstwową i cieczową chromatografię ciśnieniową określono peptyd jako zasadniczo biorąc czysty.

P r z y k ł a d III. Syntezę skróconego analogu hpGRF $[Nle^{27}]$ -hpGRF/1-32/-NH₂ o wzorze: 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-Nle-Ser-Arg-Gln-Gln-Gly-NH₂ przeprowadza się stopniowo, wykorzystując syntetyzator peptydów model Beckman 990, na żywicy MBHA sposobem opisanym w przykładzie I. Wykorzystując chromatografię cienkowarstwową i cieczową chromatografię ciśnieniową określono ten analog jako zasadniczo biorąc czysty. Skręcalność optyczną zmierzono na polarymetrze fotoelektrycznym uzyskując wartość $[\alpha]_D^{22} = -57,8^\circ \pm 1/C=1$, 1% kwas octowy, nieskorygowana/. Tą samą ogólną syntezę wykorzystano dla otrzymania $[Nle^{27}]$ -hpGRF/1-44/-NH₂.

P r z y k ł a d IV. Syntezę $[Ile^{27}]$ -hpGRF/1-32/-OH o wzorze: 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-Ile-Ser-Arg-Gln-Gln-Gly-OH przeprowadza się stopniowo, wykorzystując syntetyzator peptydów model Beckman 990, na chlorometylowanej żywicy, w sposób opisany na końcu przykładu I. Wykorzystując chromatografię cienkowarstwową i cieczową chromatografię ciśnieniową określono peptyd jako zasadniczo biorąc czysty. Skręcalność optyczną zmierzono na polarymetrze fotoelektrycznym uzyskując wartość $[\alpha]_D^{22} = -61,7^\circ \pm 1/C=1$, 1% kwas octowy, nieskorygowana/.

Syntezę powtórzono wykorzystując żywicę MBHA do wytworzenia tego samego peptydu w postaci amidowanej.

P r z y k ł a d V. Syntezę $[His^1]$ -hpGRF/1-32/-NH₂ o wzorze: H-His-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-NH₂ przeprowadza się stopniowo, wykorzystując syntetyzator peptydów model Beckman 990, na żywicy MBHA w sposób opisany w przykładzie I. Wykorzystując chromatografię cienkowarstwową i cieczową chromatografię ciśnieniową określono peptyd jako zasadniczo biorąc czysty. Skręcalność optyczną zmierzono na polarymetrze fotoelektrycznym, uzyskując wartość $[\alpha]_D^{22} = -58,7^\circ \pm 1/C=1$, 1% kwas octowy, nieskorygowana/.

Syntezę powtórzono stosując Phe jako ostatnią resztę celem wytworzenia $[Phe^1]$ -hpGRF/1-32/-NH₂. Skręcalność optyczną zmierzono na polarymetrze fotoelektrycznym uzyskując wartość $[\alpha]_D^{22} = -58,2^\circ \pm 1/C=1$, 1% kwas octowy, nieskorygowana/.

P r z y k ł a d VI. Syntezę $[Phe^{10}]$ -hpGRF/1-32/-NH₂ o wzorze: H-Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Phe-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-Ser-Arg-Gln-Gln-Gly-NH₂ przeprowadza się stopniowo wykorzystując syntetyzator peptydów model Beckman 990, na żywicy MBHA sposobem opisanym w przykładzie I. Wykorzystując chromatografię cienkowarstwową i cieczową chromatografię ciśnieniową określono peptyd zasadniczo jako czysty. Skręcalność optyczną zmierzono na polarymetrze fotoelektrycznym i uzyskano wartość $[\alpha]_D^{22} = -59,5^\circ \pm 1/C=1$, 1% kwas octowy, nieskorygowana/.

P r z y k ł a d VII. Syntezę $[Val^{27}]$ -hpGRF/1-32/-OH o wzorze: 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-Val-Ser-Arg-Gln-Gln-Gly-OH przeprowadza się stopniowo wykorzystując syntetyzator peptydów model Beckman 990, na chlorometylowanej żywicy, sposobem opisanym na końcu przykładu I. Wykorzystując chromatografię cienkowarstwową i cieczową chromatografię ciśnieniową określono peptyd zasadniczo jako czysty. Skręcalność optyczną zmierzono na polarymetrze fotoelektrycznym uzyskując wartość $[\alpha]_D^{22} = -62,4^\circ \pm 1/C=1$, 1% kwas octowy, nieskorygowana/.

P r z y k ł a d VIII. Syntezę $[His^1, Nle^{27}]$ -hpGRF/1-32/-NH₂ o wzorze: H-His-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-Nle-Ser-Arg-Gln-Gln-Gly-NH₂ przeprowadza się stopniowo, wykorzystując syntetyzator peptydów model Beckman 990, na żywicy MBHA sposobem opisanym w przykładzie I. Na drodze chromatografii cienkowarstwowej i cieczowej chromatografii ciśnieniowej określono peptyd zasadniczo jako czysty. Skręcalność optyczna zmierzona na polarymetrze fotoelektrycznym wynosiła $[\alpha]_D^{22} = -59,3^{\circ} \pm 1/C=1$, 1% kwas octowy, nieskorygowana/.

P r z y k ł a d IX. Syntezę analogu hpGRF, tzn. $[Nle^{27}]$ -rhGRF-/1-32/-NH₂ o wzorze: H-His-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Ser-Ser-Tyr-Arg-Arg-Ile-Leu-Gly-Gln-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-His-Glu-Ile-Nle-Asn-Arg-Gln-Gln-Gly-NH₂ przeprowadza się stopniowo, wykorzystując syntetyzator peptydów model Beckman 990, na żywicy MBHA jak w przykładzie I. Wykorzystując chromatografię cienkowarstwową i cieczową chromatografię ciśnieniową określono ten analog zasadniczo biorąc jako czysty. Skręcalność optyczna, zmierzona na polarymetrze fotoelektrycznym, wynosi $[\alpha]_D^{22} = -55,8^{\circ} \pm 1/C=1$, 1% kwas octowy, nieskorygowana/.

P r z y k ł a d X. Syntezę fragmentu analogu hpGRF, tzn. $[D-Tyr^{10}]$ -rhGRF/1-29/-NH₂ o wzorze: H-His-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Ser-Ser-D-Tyr-Arg-Arg-Ile-Leu-Gly-Gln-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-His-Glu-Ile-Met-Asn-Arg-NH₂ przeprowadza się stopniowo, wykorzystując syntetyzator peptydów model Beckman 990, na żywicy MBHA jak w przykładzie I. Wykorzystując chromatografię cienkowarstwową i cieczową chromatografię ciśnieniową określono peptyd jako zasadniczo biorąc czysty.

Syntezę powtórzono podstawiając D-Tyr zamiast His na końcowym atomie N. Otrzymano $[D-Tyr^{1,10}]$ -rhGRF/1-29/-NH₂. Skręcalność optyczną zmierzono na polarymetrze fotoelektrycznym uzyskując wartość $[\alpha]_D^{22} = -53,6^{\circ} \pm 1/C=1$, 1% kwas octowy, nieskorygowana/.

P r z y k ł a d XI. Syntezę $[Nle^{27}]$ -rhGRF/1-29/-NH₂ o wzorze: H-His-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Ser-Ser-Tyr-Arg-Arg-Ile-Leu-Gly-Gln-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-His-Glu-Ile-Nle-Asn-Arg-Gln-Gln-Gly-NH₂ przeprowadza się stopniowo, wykorzystując syntetyzator peptydów model Beckman 990, na żywicy MBHA, jak w przykładzie I. Wykorzystując chromatografię cienkowarstwową i cieczową chromatografię ciśnieniową określono peptyd jako zasadniczo biorąc czysty. Skręcalność optyczną zmierzono na polarymetrze fotoelektrycznym, uzyskując wartość $[\alpha]_D^{22} = -52,6^{\circ} \pm 1/C=1$, 1% kwas octowy, nieskorygowana/.

P r z y k ł a d XII. Syntezę analogu hpGRF, tzn. $[D-His^1, D-Tyr^{10}, D-Ala^{15}]$ -rhGRF/1-29/-NH₂ o wzorze: H-D-His-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Ser-Ser-D-Tyr-Arg-Arg-Ile-Leu-D-Ala-Gln-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-His-Glu-Ile-Met-Asn-Arg-NH₂ przeprowadza się stopniowo, wykorzystując syntetyzator peptydów model Beckman 990, na żywicy MBHA jak w przykładzie I. Wykorzystując chromatografię cienkowarstwową i cieczową chromatografię ciśnieniową określono peptyd jako zasadniczo biorąc czysty. Skręcalność optyczna zmierzona na polarymetrze fotoelektrycznym wynosi $[\alpha]_D^{22} = -54,5^{\circ} \pm 1/C=1$, 1% kwas octowy, nieskorygowana/.

P r z y k ł a d XIII. Syntezę analogu hpGRF, tzn. $[Tyr^1]$ -rhGRF-/1-29/-NH₂ o wzorze: H-Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Ser-Ser-Tyr-Arg-Arg-Ile-Leu-Gly-Gln-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-His-Glu-Ile-Met-Asn-Arg-NH₂ przeprowadza się stopniowo w syntetyzatorze peptydów model Beckman 990, na żywicy MBHA, jak w przykładzie I. Wykorzystując chromatografię ciśnieniową i cienkowarstwową określono peptyd jako zasadniczo biorąc czysty. Skręcalność optyczna zmierzona na polarymetrze fotoelektrycznym wynosi $[\alpha]_D^{22} = -49,7^{\circ} \pm 1/C=1$, 1% kwas octowy, nieskorygowana/.

Z a s t r z e z e n i e p a t e n t o w e

Sposób wytwarzania nowych biologicznie czynnych peptydów o wzorze 1: $H-R_1-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-R_8-Ser-R_{10}-Arg-R_{12}-R_{13}-Leu-R_{15}-Gln-Leu-R_{18}-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-R_{24}-R_{25}-Ile-R_{27}-R_{28}-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-R_{34}-Asn-Gln-Glu-R_{38}-R_{39}-R_{40}-Arg-R_{42}-R_{43}-R_{44}-Y$, w którym R_1 oznacza Tyr, Met, D-Tyr, Phe, D-Phe, Leu, D-His lub His; R_8 oznacza Ser lub Asn; R_{10} oznacza Tyr, Phe lub D-Tyr; R_{12} oznacza Arg lub Lys; R_{13} oznacza Ile lub Val; R_{15} oznacza Gly lub D-Ala; R_{18} oznacza Tyr lub Ser; R_{24} oznacza His lub Gln; R_{25} oznacza Glu lub Asp; R_{27} wybrany jest z grupy obejmującej izomery D i L Ala, Nle, Ile, Leu i Val; R_{28} oznacza Ser, Asn lub D-Ala; R_{34} oznacza Arg lub Ser; R_{38} oznacza Gln lub Arg; R_{39} oznacza Arg lub Gly; R_{40} oznacza Ser lub Ala; R_{42} oznacza Phe lub Ala; R_{43} oznacza Asn lub Arg; R_{44} oznacza resztę naturalnego aminokwasu lub des- R_{44} ; Y oznacza grupę $-COOH$ lub $-CONH_2$ lub o długości łańcucha od R_1 do co najmniej R_{27} , z n a m i e n n y t y m, że aminokwasy, w których przynajmniej grupy α -aminowe są zabezpieczone, sprzęga się ze sobą w kolejności określonej wzorem 1 w łańcuch o długości od R_1 do co najmniej R_{27} , metodą syntezy na fazie stałej stosując 1 do 2 milimoli zabezpieczonego aminokwasu na 1 g żywicy, w rozpuszczalniku, korzystnie w chlorku metylenu lub dimetyloformamidzie lub w ich mieszaninie, po czym z wytworzonego peptydu zawierającego co najmniej jedną grupę zabezpieczającą, o wzorze 2: X^1-R_1/X lub $R^2/-Ala-Asp-/X^3/-Ala-Ile-Phe-Thr/X^4/-R_8/X^4$ lub $X^5/-Ser/X^4/-R_{10}/X^2/-Arg/X^6/-R_{12}/X^6$ lub $X^7/-R_{13}-Leu-R_{15}-Gln/X^5/-Leu-R_{18}/X^2/-Ala-Arg/X^6/-Lys/X^7/-Leu-Leu-R_{24}/X$ lub $X^5/-R_{25}/X^3/-Ile-R_{27}-R_{28}/X^4$ lub $X^5/-Arg/X^6/-Gln/X^5-Gln/X^5/-Gly-Glu/X^3/-R_{34}/X^4$ lub $X^6/-Asn/X^5/-Gln/X^5/-Glu/X^3/-R_{38}/X^5$ lub $X^6/-R_{39}/X^6/-R_{40}/X^4/-Arg/X^6/-R_{42}-R_{43}/X^5$ lub $X^6/-R_{44}/X^8/-X^9$, w którym X^1 oznacza atom wodoru lub grupę zabezpieczającą grupę α -aminową, korzystnie BOC, X oznacza atom wodoru lub grupę zabezpieczającą azot imidazolu w His, korzystnie Tos, X^2 oznacza atom wodoru lub grupę zabezpieczającą fenolową grupę hydroksylową Tyr, korzystnie grupę 2,6-dichlorobenzylową, X^3 oznacza atom wodoru lub grupę zabezpieczającą grupę karboksylową Asp lub Glu, korzystnie Bzl, X^4 oznacza atom wodoru lub grupę zabezpieczającą alkoholową grupę hydroksylową Thr lub Ser, korzystnie grupę Bzl, X^5 oznacza atom wodoru lub grupę zabezpieczającą amidową grupę bocznego łańcucha Asn lub Gln, korzystnie grupę Xan, X^6 oznacza atom wodoru lub grupę zabezpieczającą grupę guanidynową Arg, korzystnie Tos, X^7 oznacza atom wodoru lub grupę zabezpieczającą grupę aminową bocznego łańcucha Lys, korzystnie grupę 2-chlorobenzylloksykarbonylową, X^8 oznacza atom wodoru lub grupę zabezpieczającą boczny łańcuch, jak określono powyżej, X^9 oznacza $-O-CH_2$ -nośnik polimerowy lub $-NH$ -nośnik polimerowy, a R_1 , R_8 , R_{10} , R_{12} , R_{13} , R_{15} , R_{18} , R_{24} , R_{25} , R_{27} , R_{28} , R_{34} , R_{38} , R_{39} , R_{40} , R_{42} , R_{43} i R_{44} mają wyżej podane znaczenie lub z peptydu o długości łańcucha od R_1 do co najmniej R_{27} usuwa się grupy zabezpieczające i odszczepia się peptyd zawierający co najmniej 27 reszt aminokwasów od nośnika polimerowego przy użyciu kwasu trójfluorooctowego w rozpuszczalniku, korzystnie CH_2Cl_2 , a następnie fluorowodoru ze zmiataczem, korzystnie anizolem lub sulfidem metylowo-etylowym lub ich mieszaniną, w niskiej temperaturze, korzystnie około $0^\circ C$ do $-20^\circ C$, po czym rozpuszcza się w rozpuszczalniku, korzystnie w kwasie octowym i oczyszcza się znanym sposobem.