

(19) DANMARK



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 156957 B

(21) Patentansøgning nr.: 2549/82

(51) Int.Cl.⁴

C 07 K 7/10

(22) Indleveringsdag: 07 jun 1982

C 07 K 7/38

(41) Alm. tilgængelig: 09 dec 1982

(44) Fremlagt: 23 okt 1989

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 08 jun 1981 US 271624

(71) Ansøger: THE *SALK INSTITUTE FOR BIOLOGICAL STUDIES; 10010 North Torrey Pines Road; La Jolla; Californien, US

(72) Opfinder: Wylie Walker *Vale Jr.; US, Joachim *Spiess; US, Catherine Laure *Rivier; US, Jean Edouard Frederick *Rivier; US

(74) Fuldmægtig: Firmaet Chas. Hude

(54) Analogifremgangsmåde til fremstilling af CRF eller CRF-analoge peptidforbindelser og peptidmellemprodukter til gennemførelse af fremgangsmåden

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

N-afslutningsrester være fjernet eller være substitueret med et peptid, der er indtil 10 aminosyrer langt, og/eller med et acyleringsmiddel indeholdende indtil 7 carbonatomer. Ala i 41-stillingen kan også være substitueret eller fjernet, når blot den tilbageværende C-afslutning er amideret. Flere andre substitutioner kan også foretages gennem hele kæden.

2549-82

CRF (corticotropinfrigørende faktor) har formlen:

H-Ser-Gln-Glu-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Met-Thr-Lys-Ala-Asp-Gln-Leu-Ala-Gln-Gln-Ala-His-Ser-Asn-Arg-Lys-Leu-Leu-Asp-Ile-Ala-NH₂.

CRF-analoge er blevet syntetiseret, hvilke forbindelser er i det mindste lige så virksomme som CRF, og CRF eller disse CRF-analoge eller farmaceutisk acceptable salte deraf, der er dispergeret i en farmaceutisk acceptabel flydende eller fast bærer, kan administreres til pattedyr til opnåelse af en betydelig forøgelse af mængderne af ACTH, β -endorphin, β -lipotropin og corticosteron og/eller en sænkning af blodtrykket over et udstrakt tidsrum. I de analoge forbindelser kan én eller flere af de første tre

DK 156957 B

Den foreliggende opfindelse angår en analogifremgangsmåde til fremstilling af hidtil ukendte CRF eller CRF-analoge peptidforbindelser samt peptidmellemprodukter til brug som udgangsmateriale ved fremgangsmåden.

5

Eksperimentelle og kliniske iagttagelser har understøttet den opfattelse, at hypothalamus spiller en afgørende rolle med hensyn til reguleringen af adenohipofysielle corticotrope cellers sekretionsfunktioner. For mere end 25 år siden demonstrerede Guillemin, Rosenberg og Saffran og Schally uafhængigt af hinanden tilstedeværelsen af faktorer i hypothalamus, som ville forøge omfanget af ACTH-sekretion fra hypofysekirtnen, der er inkuberet in vitro eller opbevares i en organkultur. Ingen af de indtil dato karakteriserede sekretagoger opfylder de kriterier, der forventes af en fysiologisk corticotropinfrigørende faktor, CRF. Følgelig har rensning af en stor CRF været forsøgt. Udgangsmateriale for rensningen var en tidlig sidefraktion af de 490.000 hypothalamiske fragmenter fra får, der oprindeligt blev ekstraheret på laboratoriet for neuroendocrinologi ved The Salk Institute, således som beskrevet af Burgus et al. i Hypothalamus and Endocrine Functions (F. Labrie et al. eds.) Plenum, New York, 1976, side 355. Ingen af de tidligere rensningsforsøg syntes at have ført til denne CRF med høj molekylvægt i en renhed på mere end ca. 1%

25

Sauvagin er et amideret generelt lignende 40-rest peptid, som blev isoleret fra huden af den sydamerikanske frø Phyllomedusa sauvagei, og det blev karakteriseret af Erspamer et al. og blev beskrevet i Regulatory Peptides, Vol. 2 (1981), side 1-13.

30

Sauvagin har formelen:

35

pGlu-Gly-Pro-Pro-Ile-Ser-Ile-Asp-Leu-Ser-Leu-Glu-Leu-Leu-Arg-Lys-Met-Ile-Glu-Ile-Glu-Lys-Gln-Glu-Lys-Glu-Lys-Gln-Gln-Ala-Ala-Asn-Asn-Arg-Leu-Leu-Leu-Asp-Thr-Ile-NH₂.

Sauvagin er blevet omtalt som havende en biologisk virkning i henseende til sænkning af blodtrykket hos pattedyr og til stimulering af sekretionen af ACTH og β -endorphin.

- 5 Det har nu vist sig muligt at syntetisere den i henseende til virkning og struktur lignende forbindelse CRF og dermed analoge forbindelser.

10 CRF er nu blevet isoleret, rensat og karakteriseret som værende et hentetracontapeptid med formlen:

H-Ser-Gln-Glu-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Met-Thr-Lys-Ala-Asp-Gln-Leu-Ala-Gln-Gln-Ala-His-Ser-Asn-Arg-Lys-Leu-Leu-Asp-Ile-Ala-NH₂.

15

- Det kan alternativt omtales som amunin. Syntesen af 41-rest-peptidet er blevet fuldført, og såvel det isolerede CRF som det syntetiske CRF har vist sig at stimulere ACTH- og β -endorphin-aktiviteter in vitro og in vivo. Syntetisk CRF har vist sig i væsentlig grad at sænke blodtrykket i et udstrakt tidsrum. Som resultat heraf er CRF blevet gjort tilgængeligt i hovedsagelig ren form (dvs. i det væsentlige uden indhold af tilbageblivende mængder af en rå, biologisk ekstrakt eller af beslægtede syntetiske kopier), og en renhed på mindst ca. 93% eller højere er praktisk opnåelig og anvendelig til klinisk afprøvning.
- 20
- 25

- Med 41-rest-peptidet CRF analoge forbindelser, der har den nedenfor anførte formlen, har i det mindste hovedsageligt den samme biologiske aktivitet:
- 30

- R₁-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-Phe-R₁₃-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-R₂₁-Thr-Lys-Ala-Asp-Gln-Leu-Ala-Gln-Gln-Ala-R₃₂-Ser-Asn-Arg-Lys-Leu-Leu-Asp-Ile-Ala-NH₂, hvori R₁ er Ser-Gln-Glu eller Ac, R₁₃ er His eller Tyr, R₂₁ er Met, Ile eller Nle, og R₃₂ er His eller Tyr.
- 35

CRF er blevet isoleret fra fårs hypothalamiske ekstrakter, rensat og karakteriseret. Den benyttede nomenklatur til definering af peptiderne er den, som er angivet af Schroder & Lubke, "The Peptides", Academic Press (1965), hvori
 5 aminogruppen i overensstemmelse med konventionel fremstilling forekommer til venstre, og carboxylgruppen forekommer til højre. Når aminosyreresten har isomere former, er det L-formen af aminosyren, der er tale om, med mindre andet direkte er anført.

10 CRF og CRF-analoge forbindelser fremstillet ifølge opfindelser angives med følgende formel:

R_1 -Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-Phe- R_{13} -Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu- R_{21} -Thr-Lys-Ala-Asp-Gln-Leu-Ala-Gln-Gln-Ala- R_{32} -Ser-Asn-Arg-Lys-Leu-Leu-Asp-Ile-Ala-NH₂, hvori R_1 er Ser-Gln-Glu
 15 eller Ac, R_{13} er His eller Tyr, R_{21} er Met, Ile eller Nle, og R_{32} er His eller Tyr.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved det i den kendetegnende del af krav 1 anførte.

20

Opfindelsen angår endvidere peptidmellemprodukter med formlen:

X^1 -Ser(X^2)-Gln(X^4)-Glu(X^5)-Pro-Pro-Ile-Ser(X^2)-Leu-Asp(X^5)-Leu-Thr(X^2)-Phe- R_{13} (X^8)-Leu-Leu-Arg(X^3)-Glu(X^5)-Val-Leu-Glu-
 25 (X^5)- R_{21} -Thr(X^2)-Lys(X^6)-Ala-Asp(X^5)-Gln(X^4)-Leu-Ala-Gln(X^4)-Gln(X^4)-Ala- R_{32} (X^8)-Ser(X^2)-Asn(X^4)-Arg(X^3)-Lys(X^6)-Leu-Leu-Asp(X^5)-Ile-Ala-(X^7), som er ejendommelige ved, at X^1 er hydrogen eller en α -aminobeskyttelsesgruppe, X^2 er hydrogen eller en beskyttelsesgruppe for den alkoholiske hydroxylgruppe i
 30 en Ser- eller Thr-rest, X^3 er hydrogen eller en beskyttelses-

gruppe for guanidinogruppen i Arg, X^4 er hydrogen eller en beskyttelsesgruppe for amidogruppen i Gln eller Asn, X^5 er hydrogen eller en beskyttelsesgruppe for carboxylgruppen i Asp eller Glu, X^6 er hydrogen eller en beskyttelsesgruppe for sidekædeaminogruppen i Lys, X^7 er valgt blandt NH_2 , -NH-BHA-harpiksbærer og -NH-MBHA-harpiksbærer, og X^8 er hydrogen eller en beskyttelsesgruppe for imidazolnitrogenet i His eller for den phenoliske hydroxylgruppe i Tyr, forudsat at ikke alle symbolerne X^1 til X^8 står for hydrogen eller NH_2 .

10

De α -aminobeskyttelsesgrupper, der kommer i betragtning som X^1 , er de, der vides at være anvendelige inden for den kendte trinsvise syntese af polypeptider. Til klasserne af α -aminobeskyttelsesgrupper, der dækkes af X^1 , hører (1) beskyttelsesgrupper af acyltypen, såsom formyl, acrylyl(Acr), benzoyl(Bz) og acetyl(Ac), der fortrinsvis kun anvendes ved N-afslutningen; (2) beskyttelsesgrupper af den aromatiske urethantype, såsom benzyloxycarbonyl (Z) og substitueret Z, såsom N-chlorbenzyloxycarbonyl, p-nitrobenzyloxycarbonyl, p-brombenzyloxycarbonyl og p-methoxybenzyloxycarbonyl; (3) alifatiske urethanbeskyttelsesgrupper, såsom t-butyloxycarbonyl (BOC), diisopropylmethoxycarbonyl, isopropyloxycarbonyl, ethoxycarbonyl og allyloxycarbonyl; (4) beskyttelsesgrupper af cykloalkylurethantypen, såsom cyklopentyloxycarbonyl, adamantyloxycarbonyl og cyklohexyloxycarbonyl; og (5) beskyttelsesgrupper af thiourethantypen, såsom phenylthiocarbonyl. Den foretrukne α -aminobeskyttelsesgruppe er BOC.

X^2 er hydrogen eller en beskyttelsesgruppe for hydroxylgruppen i Thr og Ser og er fortrinsvis valgt blandt acetyl(Ac), benzoyl(Bz), tert.-butyl, triphenylmethyl (trityl), tetrahydropyranyl, benzylether (Bzl) og 2,6-dichlorbenzyl (DCB). Den mest foretrukne beskyttelsesgruppe er Bzl. X^2 kan være hydrogen, hvilket betyder, at der ikke findes nogen beskyttelsesgruppe på hydroxylgruppen.

X^3 er hydrogen eller en beskyttelsesgruppe for guanidinogruppen i Arg og er fortrinsvis valgt blandt nitro, p-toluensulfo-

nyl (Tos), Z, admantoloxycarbonyl og BOC eller er hydrogen.
Tos er den mest foretrukne.

X^4 er hydrogen eller en beskyttelsesgruppe for amidogrup-
pen i Asn eller Gln og er fortrinsvis xanthyl(Xan).

X^5 er hydrogen eller en esterdannende beskyttelsesgruppe
for β - eller α -carboxylgruppen i Asp eller Glu og er for-
trinsvis valgt blandt benzyl, 2,6-dichlorbenzyl, methyl,
ethyl og t-butylester. OBzl er den mest foretrukne.

X^6 er hydrogen eller en beskyttelsesgruppe for Lys's side-
kædeaminosubstituent. Eksempler på passende sidekædeamino=
beskyttelsesgrupper er Z, 2-chlorbenzyloxycarbonyl(2-Cl-
Z), Tos, t-amyloxycarbonyl(Aoc), BOC og aromatiske eller
alifatiske beskyttelsesgrupper af urethantypen som oven-
for anført.

Når Met er til stede, kan svovlatomet om ønsket beskyttes
med oxygen. Når His er til stede, kan imidazolnitrogenet
beskyttes med Tos eller 2,4-dinitrophenyl(DNP). Når Tyr
er til stede, kan hydroxylgruppen beskyttes med DCB.

Valget af en sidekædeaminobeskyttelsesgruppe er ikke kri-
tisk, men den skal være en sådan, som ikke fjernes under
afbeskyttelse af α -aminogrupperne under syntesen. α -amino=
beskyttelsesgruppen og sidekædeaminobeskyttelsesgruppen
kan derfor ikke være den samme.

X^7 vælges blandt NH_2 , -NH-BHA-harpiksbærer og -NH-MBHA-har-
piksbærer, der benyttes ved fastfasesyntese med henblik på
binding til en fast harpiksbærer, således som repræsenteret
ved formlerne:

-O-CH₂-benzyl-polyamid-harpiksbærer,
-NH-benzhydrylamin (BHA)-harpiksbærer, og
-NH-paramethylbenzhydrylamin (MBHA)-harpiksbærer.

X⁸ vælges blandt hydrogen eller en beskyttelsesgruppe for imidazolnitrogenet i His eller en beskyttelsesgruppe for den phenoliske hydroxylgruppe i Tyr.

5 Polyamidpolymeren står kommercielt til rådighed og er omtalt i detaljer i Bioorganic Chemistry, 8, 251-370 (1979), hvor en foretrukken version deraf er omtalt i fig. 6. Anvendelse af BHA- eller MBHA-harpiks foretrækkes, og spaltning fører til CRF-amidet eller CRF-analog-amidet.

10

I formlen for mellemproduktet er mindst én af grupperne X¹, X², X³, X⁴, X⁵, X⁶ og X⁸ en beskyttelsesgruppe, Afhængigt af de pågældende aminosyrer, der vælges til R-grupperne, kan disse også have en beskyttelsesgruppe tilknyttet, således som anført i det foregående og som almindelig kendt på området og nævnt i det foregående. Ved udvælgelsen af en bestemt sidekædebeskyttelsesgruppe til anvendelse ved syntesen af peptiderne, bliver følgende regler fulgt: (a) beskyttelsesgruppen skal være stabil over for reagenset og under de reaktionsbetingelser, der vælges til fjernelse af α -aminobeskyttelsesgruppen på hvert trin i syntesen, (b) beskyttelsesgruppen skal bevare sine beskyttende egenskaber og ikke blive fraspaltet under koblingsbetingelser og (c) sidekædebeskyttelsesgruppen skal kunne fjernes efter afslutning af syntesen omfattende den ønskede aminosyresekvens under reaktionsbetingelser, der ikke vil ændre peptidkæden.

15

20

25

30

Udgangspeptiderne fremstilles fortrinsvis under anvendelse af fastfasesyntese, såsom den af Merrifield beskrevet, J. Am. Chem. Soc., 85, side 2149 (1964), selv om andre ækvivalente kendte kemiske synteser også kan anvendes som ovenfor

35

nævnt. Fastfasesyntese starter ud fra den C-afsluttede
ende af peptidet ved kobling af en beskyttet α -aminosyre
til en passende harpiks som generelt anført i U.S.A. pa-
tentskrift nr. 4.244.946, hvis indhold medtages heri ved
5 henvisningen dertil. Et sådant udgangsmateriale for CRF
kan fremstilles ved at knytte α -aminobeskyttet Ala til en
BHA-harpiks.

Ala beskyttet med BOC, der er koblet til BHA-harpiksen,
under anvendelse af methylenchlorid og dimethylformamid
10 (DMF). Efter koblingen af BOC-Ala til harpiksbæreren,
fjernes α -aminobeskyttelsesgruppen, såsom ved anvendelse
af trifluoreddikesyre (TFA) i methylenchlorid, TFA alene
eller med HCl i dioxan. Fortrinsvis anvendes 50 vægt% TFA
i methylenchlorid sammen med 0,5 vægt% 1,2-ethandithiol.
15 Afbeskyttelsen udføres ved en temperatur mellem 0°C og
stuetemperatur. Andre standardspaltningsreagenser og stand-
ardbetingelser til fjernelse af specifikke α -aminobeskyt-
telsesgrupper kan benyttes, således som beskrevet i Schroder
& Lubke, "The Peptides", 1 side 72-75 (Academic Press 1965).

20 Efter fjernelse af Ala's α -aminobeskyttelsesgruppe, kob-
les de resterende α -amino- og sidekædebeskyttede amino-
syrer trinvis i den ønskede orden til opnåelse af den oven-
for definerede mellemproduktforbindelse. Som et alternativ
til tilføjelse af hver aminosyrer separat i syntesen, kan
25 nogle af dem kobles indbyrdes forud for tilsætning til fast-
fasereaktoren. Udvalgelsen af et passende koblingsreagens
hører til kendt teknik, der beherskes af fagmanden på om-
rådet. Særlig egnet som koblingsreagens er N,N'-dicyklo-
hexylcarbodiimid (DCCI).

30 De aktiverende reagenser, der anvendes ved fastfasesyntesen af
udgangspeptiderne, er velkendte inden for peptidområdet. Ek-
sempler på egnede aktiverende reagenser er carbodiimider, såsom

N,N'-diisopropylcarbodiimid og N-ethyl-N'-(3-dimethylamino=propyl)carbodiimid. Andre aktiverende reagenser og deres anvendelse til peptidkobling er beskrevet af Schroder & Lubke, *supra*, i kapitel III og af Kapoor, J. Phar. Sci., 59, side 1-27 (1970).

Hver beskyttet aminosyre eller aminosyresekvens indføres i fastfasereaktoren i ca. et firdobbelt overskud, og koblingen udføres i et medium bestående af dimethylformamid(DMF): CH_2Cl_2 (1:1) eller i DMF eller CH_2Cl_2 alene. I tilfælde, hvor koblingen udføres manuelt, måles koblingsreaktionens udfald på hvert trin i syntesen ved hjælp af ninhydrinreaktionen, således som beskrevet af E. Kaiser et al., Anal. Biochem. 34, 595 (1970). I tilfælde, hvor ufuldstændig kobling finder sted, gentages koblingsproceduren før fjernelse af α -aminobeskyttelsesgruppen forud for koblingen af den næste aminosyre. Koblingsreaktionerne kan foretages automatisk, såsom på en Beckman 990 automatic synthesizer, idet man anvender et program, såsom det af Rivier et al. omtalte, Biopolymers, 1978, 17, side 1927-1938.

Efter at den ønskede aminosyresekvens er blevet afsluttet, fjernes det intermediære peptid fra harpiksbæreren ved behandling med et reagens, såsom flydende hydrogenfluorid, der ikke alene spalter peptidet fra harpiksen, men også fraspalter alle tilbageværende sidekædebeskyttelsesgrupper x^2 , x^3 , x^4 , x^5 , x^6 og x^8 samt α -aminobeskyttelsesgruppen x^1 , til opnåelse af peptidet. Ved anvendelse af hydrogenfluorid til spaltning, medtages anisol og methylenethylsulfid i reaktionsbeholderen som rensemidler. Når Met er til stede i sekvensen, kan BOC-beskyttelsesgruppen fraspaltes med trifluoredikesyre(TFA)/ethandithiol forud for spaltningen af peptidet fra harpiksen til undgåelse af S-alkylering.

Følgende eksempler viser fremgangsmåden ifølge opfindelsen.

Eksempel 1.

Syntese af CRF med formelen:

5 H-Ser-Gln-Glu-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-Phe-His-Leu-
Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Met-Thr-Lys-Ala-Asp-Gln-Leu-Ala-
Gln-Gln-Ala-His-Ser-Asn-Arg-Lys-Leu-Leu-Asp-Ile-Ala-NH₂

og med en molekylvægt på 4.666 udføres på trinvis måde på
10 en benzhydrylaminhydrochloridharpiks, såsom den der fås
fra Bachem, Inc. og har et substitutionsinterval på ca.
0,1 til 0,5 mmol/g harpiks. Syntesen foretages på et auto-
matisk Beckman 990A peptidsynteseapparat. Kobling af BOC-
Ala resulterer i substitution af ca. 0,35 mmol Ala pr. g
15 harpiks. Alle opløsningsmidler, som benyttes, afgasses om-
hyggeligt, fortrinsvis ved indblæsning af en indifferent
gas, f.eks. helium eller nitrogen, til sikring af fravær
af oxygen, som på uheldig måde kunne oxidere svovlet i
Met-resten.

20

Efter afbeskyttelse og neutralisation opbygges peptid-
kæden trin for trin på harpiksen. Generelt anvendes et
eller to mmol BOC-beskyttet aminosyre i methylenchlorid
pr. g harpiks plus et ækvivalent 2 molær DCCI i methylen-
25 chlorid i to timer. Når BOC-Arg(Tos) kobles, anvendes en
blanding af 50% DMF og methylenchlorid. Bzl anvendes som
hydroxyl-sidekædebeskyttelsesgruppe for Ser og Thr. P-
nitrophenylester(ONp) anvendes til aktivering af carboxyl-
enden af Asn eller Gln, og f.eks. kobles BOC-Asn(ONp) nat-
30 ten over under anvendelse af ét ækvivalent HOBt i en 50%
blanding af DMF og methylenchlorid. Amidogruppen i Asn eller
Gln beskyttes ved hjælp af Xan, når DCC-kobling anvendes i

35

stedet for den aktive estermetode. 2-Cl-Z anvendes som beskyttelsesgruppe for Lys-sidekæden. Tos anvendes til beskyttelse af guanidinogruppen i Arg og af imidazolgruppen i His, og Glu's eller Asp's sidekædecarboxylgruppe beskyttes ved hjælp af OBzl. Ved afslutningen af syntesen opnås følgende peptidmellemprodukt BOC-Ser(Bzl)-Gln(Xan)-Glu(OBzl)-Pro-Pro-Ile-Ser(Bzl)-Leu-Asp(OBzl)-Leu-Thr(Bzl)-Phe-His(Tos)-Leu-Leu-Arg(Tos)-Glu(OBzl)-Val-Leu-Glu(OBzl)-Met-Thr(Bzl)-Lys(2-Cl-Z)-Ala-Asp(OBzl)-Gln(Xan)-Leu-Ala-Gln(Xan)-Gln(Xan)-Ala-His(Tos)-Ser(Bzl)-Asn(Xan)-Arg(Tos)-Lys(2-Cl-Z)-Leu-Leu-Asp(OBzl)-Ile-Ala-harpiksbærer. Xan kan være blevet fjernet delvis eller fuldstændigt ved hjælp af TFA-behandling, der anvendes til afblokering af α -aminobeskyttelsesgruppen.

For at spalte og afbeskytte den resulterende beskyttede peptid-harpiks behandles denne med 1,5 ml anisol, 0,5 ml methylethylsulfid og 15 ml hydrogenfluorid (HF) pr. g peptid-harpiks, først ved -20°C i 20 minutter og derpå ved 0°C i 0,5 time. Efter fjernelse af HF under højvakuum, vaskes harpiks-peptidet skiftevis med tør diethylether og chloroform, og peptiderne ekstraheres derpå med afgasset 2N vandig eddikesyre og skilles fra harpiksen ved hjælp af filtrering.

Peptidet renses ved hjælp af gelgennemtrængning efterfulgt af semi-præparativ HPLC som beskrevet af Rivier et al. i Peptides: Structure and Biological Function (1979), side 125-128. De kromatografiske fraktioner måles omhyggeligt ved hjælp af HPLC, og kun de fraktioner, der viste betydelig renhed, blev forenet.

Specifik optisk drejning af CRF-peptidet, der blev syntetiseret og renses på den ovenfor anførte måde, blev målt på et Perkin Elmer apparat model 141 som $[\alpha]_{\text{D}}^{22^{\circ}} = -77,5^{\circ} \pm 1,0$ ($c = 1$ i 1% eddikesyre) (uden korrektion for tilstede-

værelsen af H_2O og TFA) og viste en renhed på ca. 96%. Til afgørelse af hvorvidt den nøjagtige sekvens var opnået, blev CRF-peptidet hydrolyseret i lukkede, evakuerede rør indeholdende 4N methansulfonsyre og 0,2% tryptamin i 24 timer ved $110^{\circ}C$. Aminosyreanalyser af hydrolysaterne under anvendelse af et Beckman 121 MB aminosyreanalyseapparat viste følgende aminosyremængder:

Asp(4,02), Thr(1,85), Ser(2,76), Glu(7,0), Pro(1,58), Ala(4,03), Val(0,96), Met(0,95), Ile(1,93), Leu(8,15), Phe(1,00), Lys(2,00), His(1,95) og Arg(1,98),

hvilket bekræftede, at 41-rest-peptidstrukturen var blevet opnået.

Eksempel 2. Fremstilling af referencestof.

CRF blev ekstraheret, isoleret og renset på følgende måde. 490.000 hypothalamiske fragmenter fra får blev ekstraheret i ethanol-eddikesyre-chloroform, affedt med en blanding af ethylether og petroleumsether og underkastet gentagne udrystninger med skillesystemet 0,1% eddikesyre: n-butanol: pyridin (11:5:3). De kombinerede vandige faser viser ACTH-frigørende aktivitet.

Efter dialyse (Spectrapor 3) mod 2N HOAc blev ca. 350.000 fragmentækvivalenter af retentaterne med en vægt på 15 g underkastet gelfiltrering på "Sephadex" G-50. Hovedmængden af materialet blev kromatograferet ved koldrumstemperaturer i 9 successive forløb under anvendelse af en 3,1 x 150 cm G-50 søjle, der blev elueret med 2N HOAc. Zonen udvisende den mest signifikante ACTH-frigørende aktivitet elueredes omkring $1,3 V_e/V_o$.

En del af materialet fra denne zone, ca. 130.000 fragmentækvivalenter, blev underkastet ionbytning på SP-"Sephadex".

Prøven blev indført i 0,01M ammoniumformiatpuffer, pH 3,2, og elueret med en lineær gradient af den benyttede puffer til 1:5M ammoniumformiat, pH 7,0. ACTH-frigørende aktivitet blev svagt absorberet. Den ACTH-frigørende fraktion fra SP-"Sephadex" og det resterende af zonen fra "Sephadex"-G-50 blev opløst i 6M guanidin HCl/HOAc, pH 2,5, opvarmet i 5 minutter til 90°C og derpå kromatograferet på "Biogel" P-10 med 4M guanidin HCl/HOAc, pH 2,5. De ACTH-frigørende fraktioner blev forenet og rensat yderligere ved hjælp af successive højtrykssvækekromatografiske (HPLC) trin, der indbefattede: 1) omvendt fase HPLC på "Bondapak" CN (Waters and Associates) under anvendelse af en gradient af faldende mængde triethylammoniumphosphat (TEAP) og stigende mængde acetonitril, 2) omvendt fase HPLC på "Bondapak" C₁₈ (Waters and Associates) med TEAP/acetonitril, og enten 3a) omvendt fase HPLC på "Bondapak" CN med gradienter af triethylammoniumformiat og acetonitril eller 3b) omvendt fase HPLC på C₁₈ med gradienter af trifluoreddikesyre og acetonitril. Lyofiliserede aktive zoner fra begge HPLC-trin 3a eller 3b blev benyttet til sammensætnings- og strukturanalyse, der viste følgende sekvens:

H-Ser-Gln-Glu-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Met-Thr-Lys-Ala-Asp-Gln-Leu-Ala-Gln-Gln-Ala-His-Ser-Asn-Arg-Lys-Leu-Leu-Asp-Ile-Ala-NH₂.

25 Eksempel 3. Sammenligningseksempel.

Det syntetiske og det naturlige CRF blev undersøgt med hensyn til deres virkninger på sekretionen af ACTH og β -endorphin in vitro, og det syntetiske CRF blev også undersøgt in vivo. Den høje virkningsevne af syntetisk og naturligt CRF til stimulering af sekretionen af ACTH og β -endorphin fra dyrkede rottehypofyseceller blev målt. Minimale og halv-maksimale reaktioner blev iagttaget ved henholdsvis

ca. 10 picomolar og ca. 100 picomolar syntetisk CRF. Sekretionsreaktionerne på maksimale ($>5\text{ nM}$) koncentrationer af CRF ligger på et højt niveau. In vivo doser fra 30 ng til 3 $\mu\text{g/kg}$ legemsvægt forøgede hurtigt ACTH-sekretionen og β -endorphin-lignende (β -END-LI) sekretion til det 5 - 20-dobbelte.

Syntetisk CRF har vist sig at være en kraftig stimulator for sekretion af ACTH og β -END-LI in vivo i flere rottepræparater. Plasmamængder af ACTH og β -END-LI forøges i mindst 5 - 20 minutter efter den intravenøse administration af CRF til nembutalbedøvede hanrotter og til hvilende han- eller hunrotter med indlagt intravenøs kanyle. Endvidere viser CRF sig at have en voldsom virkning på blodtrykket i rotter og hunde. Det cartoide middelblodtryk i en urethanbedøvet rotte faldt fra 87 til 72 ± 2 mm Hg og forblev på dette niveau i 30 minutter efter en indsprøjtning svarende til 3 μg CRF/Kg legemsvægt. Efterfølgende administration af en indsprøjtning svarende til 30 μg CRF/Kg legemsvægt sænkede middelblodtrykket til 42 ± 3 mm Hg i mere end 2 timer.

Eksempel 4.

Peptidet [Tyr^{13} , Nle^{21}]-CRF med formelen:

H-Ser-Gln-Glu-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-Phe-Tyr-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Thr-Lys-Ala-Asp-Gln-Leu-Ala-Gln-Gln-Ala-His-Ser-Asn-Arg-Lys-Leu-Leu-Asp-Ile-Ala-NH₂ syntetiseres. Afprøvning i overensstemmelse med den generelle procedure, der er anført i eksempel 3, viser, at det ligeledes stimulerer sekretionen af ACTH og β -END-LI og forårsager en meget signifikant blodtrykssænkning i et større omfang end CRF. Nærmere betegnet er dets virkningsstyrke 35% større end virkningsstyrken af CRF.

Eksempel 5.

Peptidet [Acetyl-Pro⁴]-CRF med formelen:

5 Ac-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-Phe-His-Leu-Leu-Arg-
 Glu-Val-Leu-Glu-Met-Thr-Lys-Ala-Asp-Gln-Leu-Ala-Gln-Gln-
 Ala-His-Ser-Asn-Arg-Lys-Leu-Leu-Asp-Ile-Ala-NH₂ syntetiseres.
 Afprøvning i overensstemmelse med den generelle procedure,
 der er anført i eksempel 3, viser, at det ligeledes stimu-
 10 lerer sekretionen af ACTH og β -END-LI og forårsager en
 meget signifikant blodtrykssænkning i et større omfang end
 CRF. Nærmere betegnet er dets virkningsstyrke 22% større
 end virkningsstyrken af CRF.

15 Eksempel 6.

Peptidet [Nle²¹, Tyr³²]-CRF med formelen:

H-Ser-Gln-Glu-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-Phe-His-Leu-
 20 Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Thr-Lys-Ala-Asp-Gln-Leu-Ala-
 Gln-Gln-Ala-Tyr-Ser-Asn-Arg-Lys-Leu-Leu-Asp-Ile-Ala-NH₂
 syntetiseres. Afprøvning i overensstemmelse med den generel-
 le procedure, der er anført i eksempel 3, viser, at det
 ligeledes stimulerer sekretionen af ACTH og β -END-LI og
 25 forårsager en meget signifikant blodtrykssænkning i et
 større omfang end CRF. Nærmere betegnet er dets virknings-
 styrke 40% større end virkningsstyrken af CRF.

Eksempel 7.

30

Peptidet [Nle²¹]-CRF med formelen:

H-Ser-Gln-Glu-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-Phe-His-Leu-Leu-
 Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Thr-Lys-Ala-Asp-Gln-Leu-Ala-Gln-Gln-
 35 Ala-His-Ser-Asn-Arg-Lys-Leu-Leu-Asp-Ile-Ala-NH₂ syntetiseres.
 Afprøvning i overensstemmelse med den generelle procedure, der
 er anført i eksempel 3, viser, at det ligeledes stimulerer se-

kretionen af ACTH og β -END-LI og forårsager en meget signifikant blodtrykssænkning i et mindre omfang end CRF. Nærmere betegnet er dets biologiske virkningsstyrke 57% af CRF's virkningsstyrke.

5

Det er af interesse, at CRF og CRF-analoge udviste en sådan ekstrem sænkning af blodtrykket. Som resultat heraf kan disse peptider være særlig værdifulde til behandling af tilstande med højt blodtryk og også til behandling af patienter, der skal udsættes for visse typer kirurgi.

10

Eftersom CRF vidtgående stimulerer hypofyse-adrenalcorticalaksen, skulle CRF eller CRF-analoge være nyttige til stimulering af denne aksens funktioner i nogle patienttyper med lav endogen glucocorticoidproduktion. F.eks. skulle CRF være nyttig til genoprettelse af hypofyse-adrenalfunktionen i patienter, der har fået exogen glucocorticoidbehandling, og hvis adrenalcorticalfunktioner forbliver undertrykte.

15

20

De fleste andre regulerende peptider har vist sig at have virkninger på centralnervesystemet og på mave-tarmkanalen. Eftersom sekretion af ACTH og β -END er en uomgængelig nødvendighed i et dyrs reaktion på stress, er det sandsynligt, at CRF vil have signifikante virkninger på hjernen som formidler eller begrænser af legemets stressreaktion. Følgelig kan CRF også finde anvendelse til modificering af sindsstemningen og opførslen af normale og mentalt forstyrrede personer. Eftersom CRF og CRF-analoge forøger mængder af ACTH, β -END, β -lipotropin og corticosteron, kan dets administration benyttes til fremkaldelse af deres virkninger på hjernen og dens omkreds til derved at påvirke hukommelse, sindsstemning, smerteformelse etc. og mere specielt kvikhed, depression og/eller angst.

25

30

35

Det antages også, at relativt store mængder CRF eller nogle af de mere virksomme dermed analoge forbindelser kan fungere på en måde, der svarer til den måde, hvorpå GnRH-superagonister inhiberer forplantningsfunktioner. Disse peptider kan således være i stand til at desensitivisere CRF-målorganer og således være værdifulde til behandling af personer med Cushing's sygdom og lignende forstyrrelser.

CRF, CRF-analoge eller de ikke-toksiske additionssalte deraf, der er kombineret med en farmaceutisk acceptabel bærer til dannelsen af et farmaceutisk middel, kan administreres til pattedyr inklusive mennesker enten intravenøst, subkutant, intramuskulært, intranasalt, intracerebrospinalt eller oralt. Peptiderne bør være mindst ca. 93% rene og bør fortrinsvis have en renhed på mindst ca. 98%. Denne renhed betyder, at det tilsigtede peptid udgør den anførte vægt% af alle tilstedeværende lignende peptider og peptidfragmenter. Deres administration kan af en læge anvendes til sænkning af blodtrykket eller til stimulering af den endogene gluco-corticoidproduktion. Den krævede dosis vil variere med den pågældende lidelse, der behandles, med alvorligheden af lidelsen og med varigheden af den ønskede behandling.

Sådanne peptider administreres ofte i form af farmaceutisk acceptable ikke-toksiske salte, såsom syreadditionssalte eller metalkomplekser, f.eks. med zink, jern, calcium, barium, magnesium, aluminium eller lignende (der betragtes som additionssalte for såvidt angår den foreliggende ansøgning). Eksempler på sådanne syreadditionssalte er hydrochloridet, hydrobromidet, sulfatet, fosphatet, tannatet, pamoatet, oxalatet, fumaratet, gluconatet, alginatet, maleatet, acetatet, citratet, benzoatet, succinatet, malatet, ascorbatet, tartratet og lignende. Hvis den aktive bestanddel skal administreres i tabletform, kan tabletten indeholde et bindemiddel, såsom tragacanth, majsstivelse eller gelatine, et desintegrerende middel, såsom algininsyre, og

et smøremiddel, såsom magnesiumstearat. Hvis administration i flydende form ønskes, kan et sødemiddel og/eller aromamiddel anvendes, og intravenøs administration i isotonisk saltvand, phosphatpufferopløsninger og lignende kan foretages.

Peptiderne bør administreres under overvågning af en læge, og farmaceutiske midler vil sædvanligvis indeholder peptidet sammen med en konventionel farmaceutisk acceptabel bærer. Dosen vil sædvanligvis være fra ca. 1 til ca. 200 mikrogram af peptidet pr. kilogram legemsvægt af værten. I nogle tilfælde kan behandling af individer med disse peptider udføres i stedet for administration af ACTH eller corticosteroider, og i sådanne tilfælde kan en dosis så lav som ca. 10 ng/Kg legemsvægt anvendes. Som heri benyttet er alle temperaturer anført i °C, og alle forhold er volumenforhold. Procenter af flydende materialer er også volumenprocenter.

20 P a t e n t k r a v .

1. Analogifremgangsmåde til fremstilling af CRF eller CRF-analoge peptidforbindelser med formlen R^1 -Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-Phe- R_{13} -Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu- R_{21} -Thr-Lys-Ala-Asp-Gln-Leu-Ala-Gln-Gln-Ala- R_{32} -Ser-Asn-Arg-Lys-Leu-Leu-Asp-Ile-Ala-NH₂, hvori R_1 er Ser-Gln-Glu eller Ac, R_{13} er His eller Tyr, R_{21} er Met, Ile eller Nle, og R_{32} er His eller Tyr, kendet og ved, at man fra et peptidmellemprodukt med formlen:

X^1 -Ser(X^2)-Gln(X^4)-Glu(X^5)-Pro-Pro-Ile-Ser(X^2)-Leu-Asp(X^5)-Leu-Thr(X^2)-Phe- R_{13} (X^8)-Leu-Leu-Arg(X^3)-Glu(X^5)-Val-Leu-Glu-(X^5)- R_{21} -Thr(X^2)-Lys(X^6)-Ala-Asp(X^5)-Gln(X^4)-Leu-Ala-Gln(X^4)-Gln(X^4)-Ala- R_{32} (X^8)-Ser(X^2)-Asn(X^4)-Arg(X^3)-Lys(X^6)-Leu-Leu-Asp(X^5)-Ile-Ala-(X^7) eller en passende N-terminalt forkortet

version deraf, hvori X^1 er hydrogen eller en α -aminobeskyttelsesgruppe, X^2 er hydrogen eller en beskyttelsesgruppe for den alkoholiske hydroxylgruppe i en Ser- eller Thr-rest, X^3 er hydrogen eller en beskyttelsesgruppe for guanidinogruppen i Arg, X^4 er hydrogen eller en beskyttelsesgruppe for amidogruppen i Gln eller Asn, X^5 er hydrogen eller en beskyttelsesgruppe for carboxylgruppen i Asp eller Glu, X^6 er hydrogen eller en beskyttelsesgruppe for sidekædeaminogruppen i Lys, X^7 er valgt blandt NH_2 , -NH-BHA-harpiksbærer og -NH-MBHA-harpiksbærer, og X^8 er hydrogen eller en beskyttelsesgruppe for imidazolnitrogenet i His eller for den phenoliske hydroxylgruppe i Tyr, forudsat at ikke alle symbolerne X^1 til X^8 står for hydrogen eller NH_2 , fjerner beskyttelsesgrupper og eventuelt covalent bunden harpiksbærer til opnåelse af polypeptidet samt om ønsket omdanner et sådant resulterende polypeptid til et ikke-toksisk salt deraf.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendet tegnet ved, at R_{13} er His.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendet tegnet ved, at R_{13} er Tyr.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 1, 2 eller 3, kendet tegnet ved, at R_{21} er Nle.

5. Fremgangsmåde ifølge ethvert af kravene 1, 2 og 3, kendet tegnet ved, at R_{21} er Ile.

6. Fremgangsmåde ifølge ethvert af kravene 1 - 5, kendet tegnet ved, at R_{21} er Met.

7. Fremgangsmåde ifølge ethvert af kravene 1 - 6, kendet tegnet ved, at R_{32} er Tyr.

8. Fremgangsmåde ifølge ethvert af kravene 1 - 6, kendet tegnet ved, at R_{32} er His.

9. Peptid til anvendelse som udgangsmateriale ved fremgangsmåden ifølge krav 1 med formlen:

X^1 -Ser(X^2)-Gln(X^4)-Glu(X^5)-Pro-Pro-Ile-Ser(X^2)-Leu-Asp(X^5)-
 5 Leu-Thr(X^2)-Phe- R_{13} (X^8)-Leu-Leu-Arg(X^3)-Glu(X^5)-Val-Leu-Glu
 (X^5)- R_{21} -Thr(X^2)-Lys(X^6)-Ala-Asp(X^5)-Gln(X^4)-Leu-Ala-Gln(X^4)-
 Gln(X^4)-Ala- R_{32} (X^8)-Ser(X^2)-Asn(X^4)-Arg(X^3)-Lys(X^6)-Leu-Leu-
 Asp(X^5)-Ile-Ala- X^7 , k e n d e t e g n æ t ved, at X^1 er hy-
 10 drogen eller en α -aminobeskyttelsesgruppe, X^2 er hydrogen el-
 ler en beskyttelsesgruppe for den alkoholiske hydroxylgruppe i
 en Ser- eller Thr-rest, X^3 er hydrogen eller en beskyttelses-
 gruppe for guanidinogruppen i Arg, X^4 er hydrogen eller en be-
 skyttelsesgruppe for amidogruppen i Gln eller Asn, X^5 er hy-
 15 drogen eller en beskyttelsesgruppe for carboxylgruppen i Asp
 eller Glu, X^6 er hydrogen eller en beskyttelsesgruppe for si-
 dekædeaminogruppen i Lys, X^7 er valgt blandt NH_2 , -NH-BHA-
 harpiksbærer og -NH-MBHA-harpiksbærer, og X^8 er hydrogen eller
 en beskyttelsesgruppe for imidazolnitrogenet i His eller for
 den phenoliske hydroxylgruppe i Tyr, forudsat at ikke alle
 20 symbolerne X^1 til X^8 står for hydrogen eller NH_2 .

25

30

35