



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 2206/85

(51) Int.Cl.⁵ C 07 K 7/10

(22) Indleveringsdag: 17 maj 1985

(41) Alm. tilgængelig: 19 nov 1985

(44) Fremlagt: 16 sep 1991

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 18 maj 1984 US 611844

(71) Ansøger: THE *SALK INSTITUTE FOR BIOLOGICAL STUDIES; 10010 North Torrey Pines Road; LaJolla, California 92037, US

(72) Opfinder: Wylie Walker *Vale Jr.; US, Jean Edouard Frederic *Rivier; US

(74) Fuldmægtig: Firmaet Chas. Hude

(54) Syntetiske GRF-analoge peptider og farmaceutisk acceptable salte heraf samt farmaceutisk middel indeholdende peptidet eller et ikke-toksisk salt deraf

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

er Arg eller D-Arg, R₃₄ er Arg eller Ser, R₃₈ er Gln eller Arg, R₃₉ er Arg eller Gly, R₄₀ er Ser eller Ala, R₄₂ er Phe, Ala eller Val, R₄₃ er Asn eller Arg, R₄₄ er en naturlig aminosyre, forudsat imidlertid, at enhver eller alle af resterne mellem R₂₈ og R₄₄ inklusive kan være udeladt, og forudsat også, at R₂ er D-NMA og/eller R₁₄ er D-Leu og/eller R₂₉ er D-Arg. Disse peptider samt de ikke-toksiske salte deraf kan anvendes diagnostisk.

2206-85

Humant GRF(hGRF), rotte-GRF(rGRF), svine-GRF(pGRF) og kvæ-GRF(bGRF) har tidligere været karakteriseret og syntetiseret. Ifølge opfindelsen angives syntetiske peptider, der er ekstremt virksomme til stimulation af frigørelsen af hypofysært GH i dyr inklusive mennesker, hvilke peptider har modstandsevne mod enzymatisk nedbrydning i legemet og har sekvensen: R₁-R₂-R₃-Ala-Ile-Phe-Thr-R₈-Ser-R₁₀-Arg-R₁₂-R₁₃-R₁₄-R₁₅-Gln-R₁₇-R₁₈-Ala-Arg-Lys-Leu-R₂₃-R₂₄-R₂₅-Ile-R₂₇-R₂₈-R₂₉-Gln-Gln-Gly-Glu-R₃₄-Asn-Gln-Glu-R₃₈-R₃₉-R₄₀-Arg-R₄₂-R₄₃-R₄₄, hvori R₁ er Tyr, D-Tyr, Met, Phe, D-Phe, pCl-Phe, Leu, His eller D-His med enten en C^αMe- eller N^αMe-substitution eller usubstitueret, R₂ er Ala, D-Ala eller D-NMA, R₃ er Asp eller D-Asp, R₈ er Ser, Asn, D-Ser eller D-Asn, R₁₀ er Tyr eller D-Tyr, R₁₂ er Arg eller Lys, R₁₃ er Ile eller Val, R₁₄ er Leu eller D-Leu, R₁₅ er Gly eller D-Ala, R₁₇ er Leu eller D-Leu, R₁₈ er Tyr eller Ser, R₂₃ er Leu eller D-Leu, R₂₄ er His eller Gln, R₂₅ er Glu, Asp, D-Glu eller D-Asp, R₂₇ er Met, D-Met, Ala, Nie, Ile, Leu, Nva eller Val, R₂₈ er Asn eller Ser, R₂₉

Den foreliggende opfindelse angår hidtil ukendte GRF-analoge peptider, der fremmer frigørelsen af væksthormon fra hypofyse-kirtelen, farmaceutisk acceptable salte heraf samt farmaceutisk middel indeholdende disse.

5

Fysiologer har længe erkendt, at hypothalamus styrer adenohypofysens sekretionsfunktioner, idet hypothalamus producerer særlige stoffer, der stimulerer eller inhiberer sekretionen af hvert hypofysehormon. En hypothalamisk inhiberingsfaktor blev i 1972 karakteriseret i form af somastatin, der inhiberer sekretionen af væksthormon (GH). I 1982 isoleredes humane pancreas-(svulst) frigørelsesfaktorer (hpGRF) fra ekstrakter af humane pancreassvulster, hvilke faktorer blev rensset, karakteriseret, syntetiseret og afprøvet og viste sig at fremme afgørelsen af GH fra hypofysen. Begge disse hypofysiotrope faktorer er blevet genfremstillet ved hjælp af total syntese, og med de naturlige stoffer analoge forbindelser er blevet syntetiseret. Det antages, at human hypothalam GH-frigørelsesfaktor har nøjagtig den samme opbygning. Derfor anvendes udtrykket hGRF i det følgende. En tilsvarende rotte-hypothalam GH-frigørelsesfaktor (rGRF), en tilsvarende svin-hypothalam GH-frigørelsesfaktor (pGRF) og en tilsvarende kvæg-hypothalam GH-frigørelsesfaktor (bGRF) er også blevet karakteriseret og syntetiseret.

25

Syntetiske polypeptider er nu blevet syntetiseret og afprøvet, hvilke polypeptider frigør GH fra dyrkede hypofyseceller og i det mindste delvis kan modstå enzymatisk nedbrydning i legemet samt udviser meget betydelig forøget virkningsstyrke. Disse peptider har $N^{\alpha}CH_3$ -D-Ala(D-NMA) i 2-stillingen og/eller D-Leu i 14-stillingen og/eller D-Arg i 29-stillingen og har Nle i 27-stillingen. Peptiderne kan også have en af følgende rester i 1-stillingen: Tyr, D-Tyr eller His, hvilken rest eventuelt kan have en methylsubstitution i α -aminogruppen. De kan eventuelt have D-Tyr i 10-stillingen.

35

Farmaceutiske midler ifølge opfindelsen er kendetegnet ved at indeholde et peptid ifølge krav 1 eller et ikke-toksisk salt af ethvert af disse, dispergeret i en farmaceutisk eller veterinært acceptabelt flydende eller fast bærer. Sådanne farmaceutiske midler kan anvendes inden for klinisk medicin, såvel human som veterinær, til administration med henblik på terapeutiske formål og også diagnostisk. Endvidere kan de anvendes til fremme af væksten af varmblodede dyr inklusive fjerkræ og inden for hydroponik til koldblodede dyr, f.eks. fisk, ål, etc.

Den til definering af peptiderne benyttede nomenklatur er den af Schroder & Lubke anførte i "The Peptides", Academic Press (1965), hvori aminogruppen ved N-terminalen i overensstemmelse med konventionel angivelse forekommer til venstre, og carboxylgruppen ved C-terminalen forekommer til højre. Med naturlig aminosyre menes en af de almindelige naturligt forekommende aminosyrer, der findes i proteiner og omfatter Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, Thr, Lys, Arg, Asp, Asn, Glu, Gln, Cys, Met, Phe, Tyr, Pro, Trp og His. Med Nle menes norleucin. Når aminosyreresten har isomere former, er det L-formen af aminosyren, der angives, medmindre andet er udtrykkeligt anført. D-NMA betyder D-isomeren af alanin, hvori α -aminogruppen er substitueret med methyl.

De syntetiske peptider ifølge opfindelsen er kendetegnet ved følgende sekvens (I):

R_1 - R_2 -Asp-Ala-Ile-Phe-Thr- R_8 -Ser- R_{10} -Arg- R_{12} - R_{13} - R_{14} -Gly-Gln-Leu- R_{18} -Ala-Arg-Lys-Leu-Leu- R_{24} - R_{25} -Ile-Nle- R_{28} - R_{29} -Gln-Gln-Gly-NHR, hvori R er H eller lavere alkyl, R_1 er Tyr, D-Tyr eller His med N^{α} Me-substitution eller i usubstitueret form, R_2 er Ala eller D-NMA, R_8 er Ser eller Asn, R_{10} er Tyr eller D-Tyr, R_{12} er Arg eller Lys, R_{13} er Ile eller Val, R_{14} er Leu eller D-Leu, R_{18} er Tyr eller Ser, R_{24} er His eller Gln, R_{25} er Glu eller Asp, R_{28} er Asn eller Ser, og R_{29} er Arg eller D-Arg, forudsat imidlertid, at enhver sekvens af rester begyn-

dende ved C-terminalen og strækkende sig til og med R₂₈ kan være udeladt, og forudsat endvidere, at R₂ er D-NMA og/eller R₁₄ er D-Leu og/eller R₂₉ er D-Arg.

- 5 Peptiderne syntetiseres ved hjælp af en egnet metode, såsom udelukkende ved hjælp af fastfaseteknik, ved hjælp af delvis fastfaseteknik, ved fragmentkondensation eller ved hjælp af klassiske opløsningskoblinger. Anvendelse af for nylig udvik-
- 10 let rekombinant DNA-teknik kan benyttes til fremstilling af en del af en analog indeholdende kun naturlige aminosyrerester, som derpå kunne knyttes til et kort N-terminal peptid. Metoder til udelukkende fastfasesyntese er eksempelvis angivet i lærebogen "Solid-Phase Peptide Synthesis", Stewart & Young, Freeman & Co., San Francisco, 1969, og er eksemplificeret i US-patentskrift nr. 4.105.603. Klassisk opløsningssyntese er be-
- 15 skrevet detaljeret i afhandlingen "Methoden der Organischen Chemie (Houben-Weyl): Synthese von Peptiden", E. Wunsch (udgiver) (1974) Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Vesttyskland. Fragment-kondensation-syntesemetoden er eksemplificeret i US-
- 20 patentskrift nr. 3.972.859. Andre til rådighed stående syntiser er eksemplificeret i US-patentskrifterne nr. 3.842.067 og nr. 3.862.925.

- Fælles for sådanne synteser er beskyttelsen af de forskellige
- 25 aminosyremolekyldes labile sidekædegrupper med passende beskyttelsesgrupper, der vil forhindre en kemisk reaktion i at finde sted på det pågældende sted, indtil gruppen til sidst fjernes. Fælles er sædvanligvis også beskyttelsen af en α -aminogruppe på en aminosyre eller et fragment, medens denne
- 30 del eller enhed reagerer ved carboxylgruppen, efterfulgt af selektiv fjernelse af α -aminobeskyttelsesgruppen for at gøre efterfølgende reaktion mulig på dette sted. Følgelig er det fælles, som et trin i syntesen, at en intermediær forbindelse dannes, hvilken forbindelse indeholder hver af aminosyreresterne placeret i dens ønskede rækkefølge i peptidkæden med si-
- 35 dekædebeskyttelsesgruppe knyttet til de pågældende rester.

Mellemprodukter ved syntesen kan have formelen (II):

$X^1-R_1(X \text{ eller } X^2)-R_2-Asp(X^3)-Ala-Ile-Phe-Thr(X^4)-R_8(X^4 \text{ eller } X^5)-Ser(X^4)-R_{10}(X^2)-Arg(X^6)-R_{12}(X^6 \text{ eller } X^7)-R_{13}-R_{14}-Gly-Gln-$
 $(X^5)-Leu-R_{18}(X^2)-Ala-Arg(X^6)-Lys(X^7)-Leu-Leu-R_{24}(X \text{ eller } X^5)-$
 $R_{25}(X^3)-Ile-Nle-R_{28}(X^4 \text{ eller } X^5)-R_{29}(X^6)-Gln(X^5)-Gln(X^5)Gly-$
 X^9 , hvori X^1 er enten hydrogen eller en α -aminobeskyttelses-
 gruppe. α -aminobeskyttelsesgrupperne, der kommer i betragtning
 som X^1 , er de som vides at være anvendelige inden for trinvis
 syntese af polypeptider. Til klasserne af α -aminobeskyttelses-
 grupper, der kan anvendes som X^1 , hører (1) aromatiske beskyt-
 telsesgrupper af urethantype, såsom fluorenylmethyloxycarbonyl
 (Fmoc), benzyloxycarbonyl (Z) og substitueret Z, såsom p-
 chlorbenzyloxycarbonyl, p-nitrobenzyloxycarbonyl, p-bromben-
 zyloxycarbonyl og p-methoxybenzyloxycarbonyl, (2) alifatiske
 urethan-beskyttelsesgrupper, såsom t-butyloxycarbonyl (BOC),
 diisopropylmethyloxycarbonyl, isopropyloxycarbonyl, ethoxycar-
 bonyl og allyloxycarbonyl, og (3) cykloalkylbeskyttelsesgrup-
 per af urethantype, såsom cyklopentyloxycarbonyl, adamantyl-
 oxycarbonyl og cyklohexyloxycarbonyl. Den foretrukne α -amino-
 beskyttelsesgruppe er BOC, endog når en N^α -Me-substitueret
 rest benyttes i 1-stillingen.

X er hydrogen eller en beskyttelsesgruppe for imidazolnitro-
 genatomet i His, såsom Tos.

X^2 kan være en egnet beskyttelsesgruppe for den phenoliske hy-
 droxylgruppe i Tyr, såsom tetrahydropyranyl, tert.-butyl, tri-
 tyl, Bzl, CBZ, 4Br-CBZ og 2,6-dichlorbenzyl(DCB). Den fore-
 trukne beskyttelsesgruppe er 2,6-dichlorbenzyl. X^2 kan være
 hydrogen, hvilket betyder, at der ikke findes nogen sidekæde-
 beskyttelsesgruppe på aminosyreresten i denne stilling.

X^3 er hydrogen eller en egnet esterdannende beskyttelsesgruppe for carboxylgruppen i Asp eller Glu, såsom benzyl(OBzl), 2,6-dichlorbenzyl, methyl og ethyl.

5 X^4 kan være en egnet beskyttelsesgruppe for hydroxylgruppen i Thr eller Ser, såsom acetyl, benzoyl, tert.-butyl, trityl, tetrahydropyranyl, Bzl, 2,6-dichlorbenzyl og CBZ. Den foretrukne beskyttelsesgruppe er Bzl. X^4 kan være hydrogen, hvilket betyder, at der ikke findes nogen beskyttelsesgruppe på hydroxylgruppen.

10 X^5 er hydrogen eller en egnet beskyttelsesgruppe for sidekædeamidogruppen i Asn eller Gln. X^5 er fortrinsvis xanthyl(Xan).

X^6 er en egnet beskyttelsesgruppe for guanidinogruppen i Arg, såsom nitro, Tos, CBZ, adamantyloxycarbonyl og BOC, eller også er X^6 hydrogen.

15 X^7 er hydrogen eller en passende beskyttelsesgruppe for sidekædeaminogruppen i Lys. Eksempler på egnede sidekædeaminobeskyttelsesgrupper er 2-chlorbenzyloxycarbonyl(2-Cl-Z), Tos, t-amylloxycarbonyl og BOC.

20 Met kan eventuelt være beskyttet ved hjælp af oxygen, men lades fortrinsvis være ubeskyttet.

Valget af en sidekædeaminobeskyttelsesgruppe er ikke afgørende, bortset fra at man generelt vælger en, der ikke fjernes under afbeskyttelse af α -aminogrupeerne under syntesen. For nogle aminosyrer, f.eks. His, er beskyttelse imidlertid generelt
25 ikke nødvendig efter at kobling er gennemført, og beskyttelsesgrupperne kan være de samme.

30 X^9 er en egnet beskyttelsesgruppe for C-terminal-carboxylgruppen, såsom den esterdannende gruppe X^3 , eller også er X^9 er forankringsbinding, der inden for fastfasesyntese anvendes til at binde til en fast harpiksbærer, eller også er den des-
 X^9 , i hvilket tilfælde resten ved C-terminalen har en carboxyl-
del, som er Y, således som ovenfor anført. Når en fast har-

piksbærer anvendes, kan den være enhver af de hidtil kendte, såsom en med formlerne: $-O-CH_2$ -harpiksbærer, $-NH$ -benzhydrylamin (BHA)-harpiksbærer eller $-NH$ -paramethylbenzhydrylamin (MBHA)-harpiksbærer. Når det usubstituerede amid ønskes, foretrækkes anvendelse af BHA- eller MBHA-harpiks, fordi spaltning direkte fører til amidet. I tilfælde af at N-methylamidet ønskes, kan det dannes fra en N-methyl-BHA-harpiks. Hvis andre substituerede amider ønskes, eller hvis andre grupper end den frie syre ønskes ved C-terminalen, kan det være at foretrække at syntetisere peptidet under anvendelse af klassiske metoder som anført i Houben-Weyl-afhandlingen.

I formelen for mellemproduktet er mindst én af X-grupperne en beskyttelsesgruppe, eller også omfatter X^9 en harpiksbærer. Et peptid ifølge opfindelsen kan fremstilles ved (a) dannelsen af et peptid med mindst en beskyttelsesgruppe samt formelen (II), hvori X , X^1 , X^2 , X^3 , X^4 , X^5 , X^6 og X^7 er enten hydrogen eller en beskyttelsesgruppe, og X^9 er enten en beskyttelsesgruppe eller en forankringsbinding til harpiksbærer eller $des-X^9$, i hvilket tilfælde resten ved C-terminalen har en carboxymolekyldel, der er Y, (b) fraspaltning af beskyttelsesgruppen eller beskyttelsesgrupperne eller forankringsbindingen fra peptidet med formelen (II), og (c) om ønsket omdannelse af det resulterende peptid med sekvensen (I) til et ikke-toksisk salt deraf.

Ved valg af en bestemt sidekædebeskyttelsesgruppe, der skal anvendes ved syntesen af peptiderne, følges følgende generelle regler: (a) beskyttelsesgruppen bevarer fortrinsvis sine beskyttende egenskaber og fraspaltes ikke under koblingsbetingelser, (b) beskyttelsesgruppen bør være stabil over for reagenset og er med undtagelse af Xan fortrinsvis stabil under de reaktionsbetingelser, der vælges til fjernelse af α -amino-beskyttelsesgruppen på hvert trin i syntesen, og (c) sidekædebeskyttelsesgruppen skal kunne fjernes efter afslutning af syntesen indeholdende den ønskede aminosyresekvens under

0

reaktionsbetingelser, der ikke på uønsket måde vil ændre peptidkæden.

5

10

15

20

25

30

35

Når peptider ikke fremstilles under anvendelse af rekombinant DNA-teknik, fremstilles de fortrinsvis under anvendelse af fastfasesyntese, såsom den der generelt er beskrevet af Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85, side 2149 (1963), selv om andre dermed ækvivalente i og for sig kendte kemiske synteser også kan anvendes som nævnt i det foregående. Fastfasesyntese påbegyndes fra peptidets C-terminale ende ved kobling af en beskyttet α -aminosyre til en passende harpiks. Et sådant udgangsmateriale kan fremstilles ved at knytte en α -aminobeskyttet aminosyre til en chlormethyleret ester eller en hydroxymethylharpiks ved hjælp af en esterbinding eller til en BHA-harpiks eller MBHA-harpiks ved hjælp af en amidbinding. Fremstilling af hydroxymethylharpiksen er beskrevet af Bodansky et al., Chem. Ind. (London) 38, 1597-1598 (1966). Chlormethylerede harpikser fås kommercielt fra Bio Rad Laboratories, Richmond, California og fra Lab. Systems, Inc. Fremstilling af en sådan harpiks er beskrevet af Stewart et al., "Solid Phase Peptide Synthesis" (Freeman & Co., San Francisco 1969), kapitel 1, side 1 - 6. BHA- og MBHA-harpiksbærere fås kommercielt og anvendes generelt kun, når det ønskede polypeptid, som syntetiseres, har et usubstitueret amid ved C-terminalen.

Den C-terminale aminosyre kan til at begynde med kobles til den chlormethylerede harpiks i overensstemmelse med proceduren angivet i Chemistry Letters, K. Horiki et al., 165-168 (1978), under anvendelse af KF i DMF ved ca. 60°C i 24 timer under omrøring, når peptider med 29-32 aminosyrestykker skal syntetiseres. Efter kobling af den BOC-beskyttede aminosyre til harpiksbæreren, fjernes α -aminobeskyttelsesgruppen, såsom ved anvendelse af trifluoreddikesyre (TFA) i methylenchlorid eller TFA alene. Afbeskyttelsen udføres ved en temperatur mellem ca. 0°C og stuetemperatur. Andre standardspaltningsreagenser, såsom HCl i dioxan, og betingelser til fjernelse af specifikke α -aminobeskyttelsesgrupper kan

0

anvendes som beskrevet i Schroder & Lubke, "The Peptides",
1 side 72 - 75 (Academic Press 1965).

5

10

Efter fjernelse af α -aminobeskyttelsesgruppen kobles de tilbage-
værende α -amino- og sidekædebeskyttede aminosyrer trinvis
i den ønskede orden til opnåelse af den ovenfor definerede
mellemproduktforbindelse, eller også kan som alternativ til
tilføjelse af hver aminosyre separat i syntesen nogle af dem
være koblet til hinanden forud for tilsætning til fastfase-
reaktoren. Udvalgelsen af et passende koblingsmiddel ligger
inden for fagmandens viden. Særlig egnet som koblingsreagens
er N,N'-dicyklohexylcarbodiimid (DCCI).

15

20

De aktiverende reagenser, der anvendes ved fastfasesyntesen
af peptiderne, er velkendte på peptidområdet. Eksempler på
egnede aktiverende reagenser er carbodiimider, såsom N,N'-
diisopropylcarbodiimid og N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-
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).

25

30

35

Hver beskyttet aminosyre eller aminosyresekvens indføres i
fastfasereaktoren i ca. et firdobbelt eller større overskud,
og koblingen kan udføres i et medium af dimethylformamid (DMF):
 CH_2Cl_2 (1:1) eller i DMF eller CH_2Cl_2 alene. I et tilfælde,
hvor ufuldstændig kobling finder sted, gentages koblingsproce-
duren før fjernelse af α -aminobeskyttelsesgruppen forud for
koblingen af den næste aminosyre. Vellykketheden af koblings-
reaktionen på hvert trin i syntesen, hvis den udføres manuelt,
måles fortrinsvis ved hjælp af ninhydrinreaktionen, således
som beskrevet af E. Kaiser et al., Anal. Biochem. 34, 595
(1970). Koblingsreaktionerne kan udføres automatisk, såsom
på en Beckman 990 automatisk syntetisator, under anvendelse
af et program, såsom det af Rivier et al. omtalte i Biopolymers,
1978, 17, side 1927-1938.

Efter at den ønskede aminosyresekvens er blevet afsluttet,

kan mellemproduktpeptidet fjernes fra harpiksbæreren ved behandling med et reagens, såsom flydende hydrogenfluorid, der ikke alene spalter peptidet fra harpiksen, men også fraspalter alle tilbageværende sidekædebeskyttelsesgrupper X , X^2 , X^3 , X^4 , X^5 , X^6 og X^7 og forankringsbindingen X^9 og også α -aminobeskyttelsesgruppen X^1 , hvis der anvendes en, til opnåelse af peptidet i form af den frie syre. Hvis Met findes i sekvensen, fjernes BOC-beskyttelsesgruppen fortrinsvis først under anvendelse af trifluoreddikesyre (TFA)/ethandithiol forud for fraspaltning af peptidet fra harpiksen med HF til fjernelse af potentiel S-alkylering. Ved anvendelse af hydrogenfluorid til spaltning medtages anisol og methylethylsulfid i reaktionsbeholderen som skylle- eller rensemidler.

Det efterfølgende eksempel angiver en foretrukken metode til syntetisering af peptider ved hjælp af fastfaseteknikken.

Eksempel 1.

Syntesen af peptidet [$N^{\alpha}\text{MeTyr}^1$, D-NMA², D-Leu²³]-rGRF(1-43)-OH med formelen:

$N^{\alpha}\text{MeTyr}$ -D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Ser-Ser-Tyr-Arg-Arg-Ile-Leu-Gly-Gln-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-D-Leu-His-Glu-Ile-Met-Asn-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-Arg-Ser-Arg-Phe-Asn-OH

udføres på trinvis måde under anvendelse af en Beckman 990 peptidsyntetisator til en chlormethyleret harpiks med et substitutionsområde på ca. 0,1 til 0,5 mmol/g harpiks. Kobling af BOC-Asn(Xan) til harpiksen gennemføres ved hjælp af den generelle procedure, der er angivet i Chemistry Letters, supra, under anvendelse af KF i DMF ved ca. 60°C i 24 timer under omrøring, og den resulterer i substitution af ca. 0,35 mmol Asn pr. gram harpiks.

Efter afblokering og neutralisering opbygges peptidkæden trin for trin på harpiksen. Afblokering, neutralisering og tilføjelse af hver aminosyre foretages generelt i overensstemmelse

med proceduren angivet detaljeret af J. Rivier i J. Amer. Chem. Soc., 96, 2986-2992 (1974). Alle benyttede opløsningsmidler afgasses ved gennembobling med en inert gas, f.eks. helium eller nitrogen, til sikring af fravær af oxygen, som på uønsket måde kunne oxidere svovlet i Met-resten.

Afblokering udføres fortrinsvis i overensstemmelse med skema A som følger:

Skema A.

	Reagens	Blandetid (min.)
10	1. 60% TFA/2% ethandithiol	10
	2. 60% TFA/2% ethandithiol	15
	3. IPA/1% ethandithiol	0,5
	4. Et ₃ N (10%) i CH ₂ Cl ₂	0,5
	5. MeOH	0,5
15	6. Et ₃ N (10%) i CH ₂ Cl ₂	0,5
	7. MeOH (2 gange)	0,5
	8. CH ₂ Cl ₂ (2 gange)	0,5

Koblingerne udføres fortrinsvis som angivet i følgende skema B:

20 Skema B.

	Reagens	Blandetid (min.)
	9. DCCI	-
	10. Boc-aminosyre	50 - 90
	11. MeOH (2 gange)	0,5
25	12. CH ₂ Cl ₂ (2 gange)	0,5
	13. Ac ₂ O (3M) i CH ₂ Cl ₂	15,0
	14. CH ₂ Cl ₂	0,5
	15. MeOH	0,5
	16. CH ₂ Cl ₂ (2 gange)	0,5.

Kort fortalt anvendes ét eller to mmol BOC-beskyttet aminosyrer i methylenchlorid pr. gram harpiks plus ét ækvivalent 1,0 molær DCCI i methylenchlorid i 2 timer. Når BOC-Arg(TOS) kobles, anvendes en blanding af 50% DMF og methylenchlorid.

5 Bzl-ether anvendes som hydroxyl-sidekædebeskyttelsesgruppe for Ser og Thr. Amidogruppen i Asn eller Gln beskyttes eller med Xan, når DCC-kobling anvendes, som det foretrækkes. P-nitrophenylester(ONp) kan også anvendes til aktivering af carboxylenden af Asn eller Gln, og BOC-Asn(ONp) kan f.eks.

10 kobles natten over under anvendelse af ét ækvivalent HOBt i en 50% blanding af DMF og methylenchlorid, i hvilket tilfælde intet DCC tilsættes. 2-chlor-benzyloxycarbonyl(2Cl-Z) anvendes som beskyttelsesgruppe for Lys-sidekæden. Tos anvendes til beskyttelse af Arg's guanidinogruppe og His's imidazolnitrogen, og Glu- eller Asp-sidekædecarboxylgruppen beskyttes med OBzl. Tyr's phenoliske hydroxylgruppe beskyttes med 2,6-dichlorbenzyl(DCB). Ved syntesens afslutning opnås følgende sammensætning:

20 BOC-N^αMeTyr(X²)-D-NMA-Asp(X³)-Ala-Ile-Phe-Thr(X⁴)-Ser(X⁴)-Ser(X⁴)-Tyr(X²)-Arg(X⁶)-Arg(X⁶)-Ile-Leu-Gly-Gln(X⁵)-Leu-Tyr=(X²)-Ala-Arg(X⁶)-Lys(X⁷)-Leu-D-Leu-His(X)-Glu(X³)-Ile-Met-Asn(X⁵)-Arg(X⁶)-Gln(X⁵)-Gln(X⁵)-Gly-Glu(X³)-Arg(X⁶)-Asn(X⁵)-Gln(X⁵)-Glu(X³)-Gln(X⁵)-Arg(X⁶)-Ser(X⁴)-Arg(X⁶)-Phe-Asn(X⁵)-X⁹, hvor X² er DCB, X³ er OBzl, X⁴ er Bzl, X⁵ er Xan, X⁶ er Tos, X⁷ er 2Cl-Z, og X⁹ er -O-CH₂-harpiksbærer. Xan kan helt eller delvis være fjernet ved hjælp af TFA-behandling, der anvendes til afblokering af α-aminobeskyttelsesgruppen.

25

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

35

Det fraspaltede og afbeskyttede peptid opløses derpå i 0 - 5% eddikesyre og underkastes rensning, som kan omfatte filtrering med fin gel af "Sephadex" G-50.

5 Peptidet renses derpå yderligere ved hjælp af præparativ eller halvpræparativ HPLC som beskrevet af Rivier et al., Peptides: Structure and Biological Function, (1979), side 125 - 128, og Marki et al. J. Am. Chem. Soc. 103, 3178 (1981). Patroner, der passer til Waters Associates prep LC-500, pakkes med 15 - 20 μC_{18} -silica fra Vydac (300A). En gradient af CH_3CN i TEAP dannes ved hjælp af en Eldex lavtryksgradientdanner, således som beskrevet af J. Rivier i J. Liq. Chromatography 1, 343-367 (1978). De kromatografiske fraktioner måles omhyggeligt ved hjælp af HPLC, og kun de fraktioner, der udviser væsentlig renhed, samles. Afsaltning af de rensede fraktioner, 15 der er kontrolleret uafhængigt for renhed, opnås ved anvendelse af en gradient af CH_3CN i 0,1% TFA. Midterfraktionen lyofiliseres derpå til opnåelse af det ønskede peptid, hvis renhed kan være større end 98%.

20 Syntesen gentages under anvendelse af en MBHA-harpiks til fremstilling af det samme peptid med en amideret C-terminal under anvendelse af en begyndelsesprocedure som generelt beskrevet af Vale et al. i US patentskrift nr. 4.292.313 til at knytte Asn til MBHA-harpiksen.

Eksempel 2.

25 Syntesen af et amideret 40-rest-peptid [$\text{C}^\alpha\text{MeHis}^1$, D-NMA^2 , D-Leu^{23}]-hGRF(1-40)- NH_2 med formelen:

$\text{H-C}^\alpha\text{MeHis-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-D-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-Ser-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Ser-Asn-Gln-Glu-Arg-Gly-Ala-NH}_2$

5 udføres på trinvis måde under anvendelse af en Beckman 990 peptidsyntetisator til en MBHA-harpiks som generelt beskrevet af Vale et al. i US patentskrift nr. 4.292.313. Peptidet bedømmes som værende i det væsentlige rent ved anvendelse af TLC og HPLC.

Eksempel 3.

Syntesen af det analoge hGRF-fragment $[D-NMA^2, Nle^{27}]$ -hGRF(1-32)-NH₂ med formlen:

10 H-Tyr-D-NMA-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

15 udføres på trinvis måde under anvendelse af en Beckman 990 peptidsyntetisator til en MBHA-harpiks som i eksempel 2. Denne analog bedømmes som værende i det væsentlige ren ved anvendelse af TLC og HPLC.

Eksempel 4.

Syntesen af det analoge hGRF-fragment $[D-NMA^2, Nle^{27}]$ -hGRF(1-29)-NH₂ med formlen:

20 H-Tyr-D-NMA-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-NH₂

25 udføres på trinvis måde under anvendelse af en Beckman 990 peptidsyntetisator til en MBHA-harpiks som i eksempel 2. Peptidet bedømmes som værende i det væsentlige rent ved anvendelse af TLC og HPLC.

Syntesen gentages til fremstilling af $[D-NMA^2, Nle^{27}]$ -hGRF(1-27)-NH₂.

Eksempel 5.

Syntesen af $[D-NMA^2, Nle^{27}]$ -rGRF(1-29)-NH₂ med formlen:

H-His-D-NMA-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-
NH₂

udføres på trinvis måde under anvendelse af en Beckman 990
peptidsyntetisator til en MBHA-harpiks som i eksempel 2. Pep-
tidet bedømmes som værende i det væsentlige rent ved anvendel-
se af TLC og HPLC.

10 Eksempel 6.

Syntesen af $[D-NMA^2, D-Glu^{25}, Nle^{27}]$ -hGRF(1-29)-NH₂ med form-
len:

H-Tyr-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-
Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-D-Glu-Ile-Nle-Ser-
Arg-NH₂

udføres på trinvis måde under anvendelse af en Beckman 990
peptidsyntetisator til en MBHA-harpiks som i eksempel 2. Pep-
tidet bedømmes som værende i det væsentlige rent ved anvendel-
se af TLC og HPLC.

20 Eksempel 7.

Syntesen af $[D-NMA^2, D-Asp^{3,25}]$ -hGRF(1-32)-NH₂ med formlen:

H-Tyr-D-NMA-D-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-
Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-D-Asp-Ile-Met-
Ser-Arg-Gln-Gln-Gly-NH₂

udføres på trinvis måde under anvendelse af en Beckman 990 peptidsyntetisator til en MBHA-harpiks som beskrevet i eksempel 2. Denne analog bedømmes som værende i det væsentlige ren ved anvendelse af TLC og HPLC.

5 Eksempel 8.

Syntesen af $[D-NMA^2, Nle^{27}]$ -pGRF(1-29)-NH₂ med formlen:

H-Tyr-D-NMA-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-NH₂

10 udføres på trinvis måde under anvendelse af en Beckman 990 peptidsyntetisator til en MBHA-harpiks som generelt beskrevet af Vale et al. i US patentskrift nr. 4.292.313. Peptidet bedømmes som værende i det væsentlige rent ved anvendelse af TLC og HPLC.

Eksempel 9.

15 Syntesen af $[D-NMA^2, Nle^{27}]$ -bGRF(1-29)-NH₂ med formlen:

H-Tyr-D-NMA-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-Asn-Arg-NH₂

20 udføres på trinvis måde under anvendelse af en Beckman 990 peptidsyntetisator til en MBHA-harpiks som generelt beskrevet af Vale et al. i US patentskrift nr. 4.292.313. Peptidet bedømmes som værende i det væsentlige rent ved anvendelse af TLC og HPLC.

Eksempel 10.

25 Syntesen af $[N^{\alpha}MeHis^1, D-NMA^2, Nle^{27}]$ -pGRF(1-29)-NH₂ med formlen:

H-N^αMeHis-D-NMA-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-NH₂

- 5 udføres på trinvis måde under anvendelse af en Beckman 990 peptidsyntetisator til en MBHA-harpiks som generelt beskrevet af Vale et al. i US patentskrift nr. 4.292.313. Peptidet bedømmes som værende i det væsentlige rent ved anvendelse af TLC og HPLC.

Eksempel 11.

- 10 Syntesen af [D-NMA², Lys¹², Nle²⁷]-rGRF(1-29)-NH₂ med formelen:

H-His-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Ser-Ser-Tyr-Arg-Lys-Ile-Leu-Gly-Gln-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-His-Glu-Ile-Nle-Asn-Arg-NH₂

- 15 udføres på trinvis måde under anvendelse af en Beckman 990 peptidsyntetisator til en MBHA-harpiks som i eksempel 2. Peptidet bedømmes som værende i det væsentlige rent ved anvendelse af TLC og HPLC.

- 20 Syntesen gentages til fremstilling af [D-NMA², Val¹³, Ser¹⁸]-rGRF(1-29)-NH₂.

Eksempel 12.

Syntesen af [D-NMA², Nle²⁷, D-Arg²⁹]-pGRF(1-29)-NH₂ med formelen:

- 25 H-Tyr-D-NMA-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-D-Arg-NH₂

5 udføres på trinvis måde under anvendelse af en Beckman 990 peptidsyntetisator til en MBHA-harpiks som generelt beskrevet af Vale et al. i US patentskrift nr. 4.292.313. Peptidet be-
dømmes som værende i det væsentlige rent ved anvendelse af
TLC og HPLC. Acetatsaltet fremstilles derpå ved opløsning
af peptidet i vand og tilsætning af 1N eddikesyre. Den re-
sulterende opløsning lyofiliseres til opnåelse af eddikesyre-
saltet.

Eksempel 13.

10 Syntesen af hGRF-analogen $[D-NMA^2, Nle^{27}, D-Arg^{29}]$ -hGRF(1-29)-NH₂ med formlen:

H-Tyr-D-NMA-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-D-
Arg-NH₂

15 udføres på trinvis måde under anvendelse af en Beckman 990 peptidsyntetisator til en MBHA-harpiks som i eksempel 2. Den-
ne analog bedømmes som værende i det væsentlige ren ved an-
vendelse af TLC og HPLC.

20 Syntesen gentages til fremstilling af $[D-NMA^2, D-Leu^{14}, Nle^{27}, D-Arg^{29}]$ -hGRF(1-32)-NH₂.

Eksempel 14.

Syntesen af $[D-Leu^{14}, Nle^{27}]$ -rGRF(1-29)-NH₂ med formlen:

25 H-His-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Ser-Ser-Tyr-Arg-Arg-Ile-D-Leu-
Gly-Gln-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-His-Glu-Ile-Nle-Asn-Arg-
NH₂

udføres på trinvis måde under anvendelse af en Beckman 990 peptidsyntetisator til en MBHA-harpiks som i eksempel 2. Pep-

tidet bedømmes som værende i det væsentlige rent ved anvendelse af TLC og HPLC.

Syntesen gentages til fremstilling af [D-NMA², D-Leu¹⁴, Nle²⁷]-rGRF(1-29)-NH₂.

5 Eksempel 15.

Syntesen af hGRF-analogen [D-NMA², Nle²⁷, Asn²⁸]-hGRF(1-29)-NH₂ med formlen:

10 H-Tyr-D-NMA-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-Asn-Arg-NH₂

udføres på trinvis måde under anvendelse af en Beckman 990 peptidsyntetisator til en MBHA-harpiks som i eksempel 2. Peptidet bedømmes som værende i det væsentlige rent ved anvendelse af TLC og HPLC.

15 Eksempel 16.

Syntesen af [Nle²⁷, D-Arg²⁹]-rGRF(1-29)-NH₂ med formlen:

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-D-Arg-NH₂

20 udføres på trinvis måde under anvendelse af en Beckman 990 peptidsyntetisator til en MBHA-harpiks som i eksempel 2. Peptidet bedømmes som værende i det væsentlige rent ved anvendelse af TLC og HPLC.

Eksempel 17.

Syntesen af det hGRF-analoge fragment $[D-NMA^2, D-Tyr^{10}, Nle^{27}]$ -hGRF(1-29)-NH₂ med formlen:

5 H-Tyr-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-D-Tyr-Arg-Lys-Val-
Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Ser-
Arg-NH₂

10 udføres på trinvis måde under anvendelse af en Beckman 990
peptidsyntetisator til en MBHA-harpiks som i eksempel 2. Pep-
tidet bedømmes som værende i det væsentlige rent ved anvend-
else af TLC og HPLC.

Syntese gentages til fremstilling af $[D-NMA^2, D-Leu^{17}, Nle^{27}]$ -hGRF(1-27)-NH₂.

Eksempel 18.

15 Syntesen af det hGRF-analoge fragment $[D-NMA^2, Nle^{27}]$ -hGRF(1-
29)-NH₂ med formlen:

H-Tyr-D-NMA-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-
NHCH₂CH₃

20 udføres på trinvis måde under anvendelse af en Beckman 990
peptidsyntetisator til en chlormethyleret harpiks som i eksem-
pel 1. Peptidet spaltes fra harpiksen ved hjælp af ammonolyse
ved behandling med ethylamin. Peptidet bedømmes som værende
i det væsentlige rent ved anvendelse af TLC og HPLC.

Eksempel 19.

25 Syntesen af Syntesen af $[D-Leu^{14}, Nle^{27}]$ -rGRF(1-29)-NH₂ med
formlen:

H-His-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Ser-Ser-Tyr-Arg-Arg-Ile-D-Leu-Gly-Gln-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-His-Glu-Ile-Nle-NH₂

5 udføres på trinvis måde under anvendelse af en Beckman 990 peptidsyntetisator til en MBHA-harpiks som i eksempel 2. Peptidet bedømmes som værende i det væsentlige rent ved anvendelse af TLC og HPLC.

Eksempel 20.

Syntesen af det hGRF-analoge fragment [D-Tyr¹, D-NMA², Nle²⁷, D-Arg²⁹]-hGRF(1-29)-NH₂

10 udføres på trinvis måde under anvendelse af en Beckman 990 peptidsyntetisator til en MBHA-harpiks som i eksempel 2. Peptidet bedømmes som værende i det væsentlige rent ved anvendelse af TLC og HPLC.

15 Syntesen gentages to gange til fremstilling af [Met¹, D-NMA², Nle²⁷]-hGRF(1-27)-NH₂.

Eksempel 21.

Syntesen af det hGRF-analoge fragment [D-N^αMeTyr, D-NMA², Nle²⁷]-hGRF(1-29)-NH₂ med formelen:

20 H-D-N^αMeTyr-D-NMA-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-NH₂

25 udføres på trinvis måde under anvendelse af en Beckman 990 peptidsyntetisator til en MBHA-harpiks som i eksempel 2. Peptidet bedømmes som værende i det væsentlige rent ved anvendelse af TLC og HPLC.

Eksempel 22.

Syntesen af det hGRF-analoge fragment $[\text{His}^1, \text{D-NMA}^2, \text{Nle}^{27}]$ -hGRF(1-29)-NH₂ med formlen:

5 H-His-D-NMA-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-NH₂

10 udføres på trinvis måde under anvendelse af en Beckman 990 peptidsyntetisator til en MBHA-harpiks som i eksempel 2. Peptidet bedømmes som værende i det væsentlige rent ved anvendelse af TLC og HPLC.

Syntesen gentages to gange til fremstilling af $[\text{His}^1, \text{Nle}^{27}, \text{D-Arg}^{29}]$ -hGRF(1-27)-NH₂.

15 De syntetiske peptider, som er fremstillet ifølge eksemplerne, sammenlignes med syntetisk hpGRF(1-40)-OH ved in vitro forsøg og viser sig at udvise generelt større virkningsstyrker med hensyn til sekretion af GH og lignende egenvirkninger. Alle disse syntetiske peptider anses for biologisk aktive og potentielt anvendelige til stimulation af frigørelsen af GH fra hypofysen.

20 Til bestemmelse af den relative effektivitet af visse repræsentative syntetiske peptider med hensyn til fremme af frigørelsen af væksthormon udføres in vitro forsøg ved anvendelse af syntetisk hpGRF(1-40)-OH som standard ved sammenligning side om side med ækvimolære koncentrationer af de repræsentative analoge, som er blevet syntetiseret. Anvendte kulturer indbefatter celler af rottehypofysektirteler, der er fjernet ca. 3 - 5 dage forinden. Sådanne kulturer betragtes som optimale til sekretion af væksthormon og anvendes til den sammenlignende afprøvning på den generelle måde, der er beskrevet af Vale et al. i Endocrinology, 91, 562-572 (1972) og som nærmere beskrevet af Vale et al. i Endocrinology, 112,

25

30

1553-155 (1983). Inkubation sammen med det stof, der skal undersøges, udføres i 3 - 4 timer, og aliquot mængder af kulturmediet fjernes og behandles til måling af deres indhold af immunoreaktivt GH(ir GH) ved en godt karakteriseret radioimmunoprøve.

Resultaterne af denne sammenlignende afprøvning ved ækvimolære koncentrationer er vist i tabel 1.

10

Tabel 1.

<u>Peptid</u>		<u>Sammen-</u> <u>ligning,</u> <u>%</u>	<u>Optisk</u> <u>drejning,</u> <u>[α]²², C=1,</u> <u>1% HAc</u>
hGRF(1-40)-OH			
(standard til dette forsøg)		100%	
15	[D-NMA ² , Nle ²⁷]-hGRF(1-29)-NH ₂	1330%	57,9°
	[D-NMA ² , Nle ²⁷]-hGRF(1-27)-NH ₂	150%	56,8°
	[D-NMA ² , Nle ²⁷]-hGRF(1-29)-NH ₂ t	1130%	57,0°
	[D-NMA ² , Nle ²⁷ , Asn ²⁸]-hGRF(1-29)-NH ₂	520%	57,6°
	[D-Leu ¹⁴ , Nle ²⁷]-rGRF(1-29)-NH ₂	120%	52,6°
20	[Nle ²⁷ , D-Arg ²⁹]-rGRF(1-29)-NH ₂	386%	52,7°
	[D-NMA ² , Nle ²⁷]-rGRH(129)-NH ₂	900%	51,9°
	[D-NMA ² , D-Tyr ¹⁰ , Nle ²⁷]-hGRF(1-29)-NH ₂	270%	56,7°
	[D-NMA ² , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁹]-hGRF(1-29)-NH ₂	580%	57,8°
	[D-Tyr ¹ , D-NMA ² , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁹]-		
25	hGRF(129)-NH ₂	60%	57,5°
	[D-N ^α MeTyr ¹ , D-NMA ² , Nle ²⁷]-		
	hGRF(1-29)-NH ₂	30%	57,2°
	[His ¹ , D-NMA ² , Nle ²⁷]-hGRF(1-29)-NH ₂	260%	57,3°
	[Ac-Tyr ¹ , D-NMA ² , Nle ²⁷]-hGRF(1-29)-NH ₂	90%	56,8°
30	[D-NMA ² , Ser ¹⁸ , Nle ²⁷]-rGRF(1-29)-NH ₂	260%	52,3°
	[D-NMA ² , Nle ²⁷ , Asn ²⁸]-hGRF(1-29)-NH ₂ t	1510%	56,9°
	[D-NMA ² , Nle ²⁷]-hGRF(1-28)-NH ₂ t	140%	56,5°
	[D-NMA ² , Nle ²⁷ , Asn ²⁸]-hGRF(1-32)-NH	82%	57,9°

35

In vitro afprøvning af disse syntetiske peptider viser, at mange af dem har overraskende større biologisk virkningsstyrke end den, den udvises af hpGRF(1-40)-OH, og f.eks. er den

0

mindste effektive koncentration af $[D-NMA^2, Nle^{27}]$ -hGRF(1-29)- NH_2 ca. 1 picomolær.

5

10

15

20

Foruden in vitro forsøgene vedrørende sekretion af væksthormon blev de syntetiske peptider ved in vivo eksperimenter intravenøst injiceret i urethanbedøvede hanrotter, og det blev fastslået, at de undertrykker spontan GH-sekretion uden ophævelse af reaktionen på eksogent GRF. Blodprøver udtages umiddelbart før og 10, 30 og 90 minutter efter injektionerne. GH-mængder i blod, målt ved radioimmunprøve, viser, at syntetisk $[D-NMA^2, Nle^{27}]$ -hGRF(1-29)- NH_2 er ca. 6 gange mere virksomt end hGRF(1-40)-OH med hensyn til blodmængder af hypofysært GH ved måling både 10 og 30 minutter efter fjerde injektion. Andre kendte in vivo GRF-forsøg, som vides at være effektive til påvisning af sekretion af GH, anvendes til bekræftelse af disse resultater. Doser mellem ca. 50 nanogram og ca. 5 mikrogram af disse peptider pr. kg legemesvægt anses for effektive til at forårsage GH-sekretion. Nogle peptider, der in vitro udviser en biologisk virkningsstyrke, som er ca. lig med eller endog en smule mindre end standarden, udviser meget større in vivo virkningsstyrke.

25

30

35

Sådanne syntetiske hGRF-analoge og eventuelt rGRF-, bGRF- og pGRF-analoge skulle være anvendelige til humane anvendelser, ved hvilke en læge ønsker at forøge GH-produktionen. Stimulation af GH-sekretion ved hjælp af sådanne analoge har interesse for patienter med fuldstændig eller relativ GH-mangel forårsaget af underproduktion af endogent GRF. Det er endvidere sandsynligt, at forøget GH-sekretion og dennes ledsagende vækstforøgelse kunne opnås hos mennesker og dyr med normale GH-mængder. Administration skulle endvidere kunne ændre legemets fedtindhold og modificere andre GH-afhængige metaboliske, immunologiske og udviklingsmæssige processer. For eksempel kan disse analoge være anvendelige som et middel til stimulation af anabole processer i mennesker under sådanne omstændigheder, som følger efter pådragelse af forbrændinger. Som et andet eksempel kan disse analoge administreres til kommercielle varmblodede dyr, såsom høns, kalkuner, svin,

0

geder, kvæg og får, og de kan anvendes inden for hydroponik til opdræt af fisk og andre koldblodede havdyr, f.eks. havskilpadder og ål samt amfibier, til accelerering af vækst og forøgelse af forhold mellem protein og fedt, som opnås ved fodring med effektive mængder af peptiderne.

5

Til administration til mennesker bør disse syntetiske peptider have en renhed på mindst ca. 93% og fortrinsvis mindst 98%. Renhed vil i denne forbindelse referere til det tilsigtede peptid, der udgør den anførte vægt% af alle tilstedeværende peptider og peptidfragmenter. Til administration af sådanne syntetiske peptider til kommercielle og andre dyr med henblik på fremme af vækst og reduktion af fedtindhold kan en renhed så lav som ca. 5% eller endog så lav som 0,01% være acceptabel.

15

Disse syntetiske peptider eller de ikke-toksiske salte deraf i kombination med en farmaceutisk eller veterinært acceptabel bærer til dannelse af et farmaceutisk middel kan administreres til dyr inklusive mennesker enten intravenøst, subkutant, intramuskulært eller perkutant, f.eks. intranasalt eller endog oral. Administrationen kan foretages af en læge med henblik på stimulation af frigørelsen af GH, når den behandlede vært kræver en sådan terapeutisk behandling. Den krævede dosis vil variere med den pågældende tilstand, der behandles, med alvorligheden af tilstanden og med varigheden af den ønskede behandling.

25

Sådanne peptider administreres ofte i form af ikke-toksiske salte, såsom syreadditionssalte eller metalkomplekser, f.eks. med zink, jern eller lignende (der betragtes som salte til det foreliggende formål). Eksempler på sådanne syreadditionssalte er hydrochloridet, hydrobromidet, sulfatet, phosphatet, maleatet, acetatet, citratet, benzoatet, succinatet, malatet, ascorbatet, tartratet og lignende. Hvis den aktive bestanddel skal administreres oralt i tabletform, kan tabletten indeholde et bindemiddel, såsom tragacanth, majsstivelse eller

30

35

gelatine, et desintegrerende middel, såsom alginsyre, 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 eller lignende kan foretages.

Peptiderne bør administreres til mennesker under vejledning af en læge, og farmaceutiske midler vil sædvanligvis indeholde peptidet sammen med en konventionel fast eller flydende farmaceutisk acceptabel bærer. Sædvanligvis vil den parenterale dosis være fra ca. 0,01 til ca. 1 mikrogram af peptidet pr. kilogram af værtens legemsvægt.

P a t e n t k r a v.

1. Syntetisk GRF-analogt peptid eller et ikke-toksisk salt deraf, k e n d e t e g n e t ved, at det har sekvensen: R₁-R₂-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-R₈-Ser-R₁₀-Arg-R₁₂-R₁₃-R₁₄-Gly-Gln-Leu-R₁₈-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-R₂₄-R₂₅-Ile-Nle-R₂₈-R₂₉-Gln-Gln-Gly-NHR, hvor R er H eller lavere alkyl, R₁ er Tyr, D-Tyr eller His med N^αMe-substitution eller usubstitueret, R₂ er Ala eller D-NMA, R₈ er Ser eller Asn, R₁₀ er Tyr eller D-Tyr, R₁₂ er Arg eller Lys, R₁₃ er Ile eller Val, R₁₄ er Leu eller D-Leu, R₁₈ er Tyr eller Ser, R₂₄ er His eller Gln, R₂₅ er Glu eller Asp, R₂₈ er Asn eller Ser, og R₂₉ er Arg eller D-Arg, forudsat imidlertid, at enhver sekvens af rester begyndende ved C-terminalen og strækkende sig til og med R₂₈ kan være udeladt, og forudsat også, at R₂ er D-NMA og/eller R₁₄ er D-Leu og/eller R₂₉ er D-Arg.

2. Peptid ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at R₂ er D-NMA.

3. Peptid ifølge krav 1 eller 2, k e n d e t e g n e t ved, at R₂₉ er D-Arg.

4. Peptid ifølge ethvert af kravene 1-3, k e n d e t e g -
n e t ved, at R₁₄ er D-Leu.

5. Peptid ifølge ethvert af kravene 1-4, k e n d e t e g -
5 n e t ved, at R er H.

6. Farmaceutisk middel til stimulation af frigørelsen af GH i
et dyr, k e n d e t e g n e t ved, at det omfatter peptidet
ifølge krav 1 eller et ikke-toksisk salt deraf samt en farma-
10 ceutisk eller veterinært acceptabel flydende eller fast bærer
derfor.

15

20

25

30

35