



(12) **UTLEGNINGSSKRIFT**

(19) **NO**

(11) **178151**

(13) **B**

(51) **Int Cl<sup>6</sup> C 07 K 14/575**

## Styret for det industrielle rettsvern

---

(21) Søknadsnr	900775	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	20.06.89, PCT/US89/02695
(22) Inng. dag	19.02.90	(85) Videreføringsdag	19.02.90
(24) Løpedag	20.06.89	(30) Prioritet	21.06.88, US, 209537
(41) Alm. tilgj.	23.04.90		
(44) Utlegningsdato	23.10.95		

---

(71) Patentsøker	The Salk Institute for Biological Studies, 10010 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037, US
(72) Oppfinner	Jean Edouard Frederic Rivier, La Jolla, CA, US Wylie Walker Vale Jr., La Jolla, CA, US
(74) Fullmektig	J.K. Thorsens Patentbureau AS, Oslo

---

(54) **Benevnelse**     **Analogifremgangsmåte for fremstilling av terapeutisk aktive peptider**

(56) **Anførte publikasjoner**     US 4594329, US 4605642

(57) **Sammendrag**     CRF-analoger som kan tilføres for å oppnå en vesentlig økning av ACTH,  $\beta$ -endorfin,  $\beta$ -lipotropin, andre produkter av pro-opiomelanokortin-genet og kortikosteronnivåer og/eller nedsettelse av blodtrykket over en utstrakt tidsperiode. En analog som er funnet til å være særlig sterk er: H-Ser-Glu-Glu-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-His-Met-Ala-Arg-Ala-Glu-Gln-Leu-Ala-Gln-Gln-Ala-His-Ser-Asn-Arg-Lys-Leu-Met-Glu-Ile-Ile-NH<sub>2</sub>. I analogene, kan en eller flere av de første fem N-terminale rester utelates eller erstattes av et peptid med opptil 10 aminosyrer og/eller med et acyleringsmiddel inneholdende opptil 7 karbonatomer. En rekke andre substitusjoner kan også gjennomføres i kjeden. Disse analoger eller farmasøytiske eller veterinærmessige tålbare salter derav, dispergert i en farmasøytisk eller veterinærmessig tålbare væske eller fast bærer kan tilføres til pattedyr, omfattende mennesker. Disse analoger kan også anvendes som stimuleringsmiddel for å heve sinnstemning og forbedre hukommelse og læring.

Foreliggende oppfinnelse vedrører en analogifremgangsmåte for fremstilling av terapeutisk aktive peptider med formel (I):  
H-Ser-Glu-Glu-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-His-R<sub>21</sub>-Ala-Arg-Ala-Glu-Gln-Leu-Ala-Gln-Gln-Ala-His-Ser-Asn-Arg-Lys-Leu-Met-Glu-Ile-Ile-NH<sub>2</sub>, hvor R<sub>21</sub> er Met eller Nle, med den betingelse at de tre aminosyrerester i N-terminalen kan utelates og at D-Pro kan erstatte Pro i N-terminalen, eller et ikke-giftig addisjonssalt derav.

Disse og andre trekk ved oppfinnelsen fremgår av patentkravene.

Eksperimentelle og kliniske observasjoner har understøttet oppfatningen om at hypotalamus spiller en nøkkelrolle i reguleringen av sekresjonsfunksjonene hos adenohipofyse kortikotrope celler. For over 25 år siden, viste Guillemin, Rosenberg og Saffran og Schally uavhengig av hverandre tilstedeværelsen av faktorer i hypotalamus som økte graden av ACTH-sekresjon i hypofysen inkubert in vitro eller holdt i en organkultur. Ingen av de karakteriserte sekresjonsstimulerende substanser imøtekom kriteriene som var forventet av en fysiologisk kortikotropin-frigivelsesfaktor (CRF) inntil ovin CRF (oCRF) ble karakterisert i 1981 og, som angitt i US patent nr 4.415.558, ble funnet å ha formelen: 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-NH<sub>2</sub>.

Sauvagin er et amidert og generelt lignende peptid med 40 rester som ble isolert fra huden hos den sydamerikanske frosken *Phylomedusa sauvagei*. Det ble karakterisert av Erspamer et al og ble beskrevet i *Regulatory Peptides*, vol. 2 (1981), side 1 - 13. Sauvagine har formelen: 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-NH<sub>2</sub>. Sauvagin og oCRF har blitt rapportert til å ha biologisk aktivitet som nedsetting av

blodtrykket i pattedyr og stimulering av sekresjonen av ACTH og  $\beta$ -endorfin.

CRF (rCRF) fra rotte er isolert, rensset og karakterisert som et hentetrakontapeptid med formelen: H-Ser-Glu-Glu-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Met-Ala-Arg-Ala-Glu-Gln-Leu-Ala-Gln-Gln-Ala-His-Ser-Asn-Arg-Lys-Leu-Met-Glu-Ile-Ile-NH<sub>2</sub>. Det kan alternativt omtales som rotte-amunin. Formelen for humant CRF er nå bestemt til å være den samme som formelen for rCRF. Syntetisk rCRF og oCRF stimulerer ACTH og  $\beta$ -endorfinaktiviteter in vitro og in vivo og nedsetter blodtrykket vesentlig i en utstrakt tidsperiode.

Analoger av disse CRF-peptider med 41 rester har i det minste stort sett den samme biologiske aktivitet med hensyn til det ovennevnte som de native peptider.

Farmasøytiske preparater som omfatter slike CRF-analoger eller ikke-giftige addisjonssalter derav dispergert i en farmasøytisk eller veterinærmessig tålbart væske eller fast bærer, kan tilføres til dyr eller mennesker for å regulere sekresjon av ACTH,  $\beta$ -endorfin,  $\beta$ -lipotropin, andre produkter av pro-opiomelanokortingenet, og kortikosteron og/eller for å nedsette blodtrykket og/eller for å påvirke sinnsstemning, oppførselen og gastrointestinale funksjoner og aktiviteter i det autonome nervesystem. Videre kan CRF-analoger anvendes for å evaluere status for hypofysefunksjoner og for kardiovaskulære, gastrointestinale eller sentralnervesystemfunksjoner.

Den nomenklatur som anvendes for å definere peptidene er den som er spesifisert av Schroder & Lubke, "The Peptides", Academic Press (1965) hvor aminogruppen på vanlig måte er til venstre og karboksylgruppen til høyre. Det anvendes standard forkortelser på tre bokstaver for å identifisere  $\alpha$ -aminosyre-restene og der hvor aminosyreresten har isomere former det L-formen av aminosyren som er representert om intet annet er uttrykkelig indikert, f. eks Ser = L-serin, Nle = L-norleucin, Nva = norvalin, Har = homoarginin, Orn = ornitin osv. I

tillegg, anvendes følgende forkortelser: leu = enten L-leucin eller C CH<sub>3</sub>-leucin (CML) og ala = enten L-alanin eller C CH<sub>3</sub>-L-alanin (CMA).

Oppfinnelsen vedrører således en analogifremgangsmåte for fremstilling av terapeutisk aktive peptider med formel (I): H-Ser-Glu-Glu-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-His-R<sub>21</sub>-Ala-Arg-Ala-Glu-Gln-Leu-Ala-Gln-Gln-Ala-His-Ser-Asn-Arg-Lys-Leu-Met-Glu-Ile-Ile-NH<sub>2</sub>, hvor R<sub>21</sub> er Met eller Nle, med den betingelse at de tre aminosyrerester i N-terminalen kan utelates og at D-Pro kan erstatte Pro i N-terminalen, eller et ikke-giftig addisjonssalt derav, og er kjennetegnet ved at individuelle aminosyrer eller korte peptider kobles til å danne et peptid-mellomprodukt med minst en beskyttende gruppe og med formel (II) eller en versjon av denne som er forkortet i N-terminalen:

X<sup>1</sup>-Ser(X<sup>2</sup>)-Glu(X<sup>5</sup>)-Glu(X<sup>5</sup>)-Pro-Pro-Ile-Ser(X<sup>2</sup>)-Leu-Asp(X<sup>5</sup>)-Leu-Thr(X<sup>2</sup>)-Phe-His(X)-Leu-Leu-Arg(X<sup>3</sup>)-Glu(X<sup>5</sup>)-Val-Leu-His(X)-R<sub>21</sub>-Ala-Arg(X<sup>3</sup>)-Ala-Glu(X<sup>5</sup>)-Gln(X<sup>4</sup>)-Leu-Ala-Gln(X<sup>4</sup>)-Gln(X<sup>4</sup>)-Ala-His(X)-Ser(X<sup>2</sup>)-Asn(X<sup>4</sup>)-Arg(X<sup>3</sup>)-Lys(X<sup>6</sup>)-Leu-Met-Glu(X<sup>5</sup>)-Ile-Ile-X<sup>7</sup> hvor R-gruppen er som angitt over, X, X<sup>1</sup>, X<sup>2</sup>, X<sup>3</sup>, X<sup>4</sup>, X<sup>5</sup> og X<sup>6</sup> er hver enten hydrogen eller en beskyttende gruppe og X<sup>7</sup> er enten en beskyttende gruppe eller NH<sub>2</sub> eller en forankringsbinding til en harpiksbærer,

den eller de beskyttelsesgrupper og forankringsbindingen avspaltes fra nevnte peptid-mellomprodukt med formel (II) og om ønsket, omdannes det oppnådde peptid til et ikke-giftig addisjonssalt derav.

Disse analoger betraktes til å være minst like sterke som nativ CRF. Disse analoger omfatter aminosyrerester med et høyt α-spiraldannende potensial.

Peptidene syntetiseres ved hjelp av en passende metode, som fastfaseteknikker, ved delvis fastfaseteknikker, ved fragmentkondensasjon eller ved klassisk oppløsningsaddisjon. Visse CRF-analoger som ikke omfatter D-isomer-rester eller ikke-

naturlige aminosyrerester kan også syntetiseres ved hjelp av nylig utviklede rekombinant DNA-teknikker.

Syntese ved anvendelse av rekombinant DNA-teknikker kan forstås til å omfatte en passende anvendelse av et strukturgen som koder for den ønskede form av CRF-analogen. Et slikt syntetisk CRF-peptid kan oppnås ved å transformere en mikroorganisme ved anvendelse av en ekspresjonsvektor omfattende en promoter og operator sammen med et slikt strukturgen og fører til at slike transformerte mikroorganismer uttrykker CRF-analog peptidet. Et ikke-humant dyr kan også anvendes for å danne CRF-analog peptidet ved gendyrking ("gene farming") hvis generelle teknikk er kjent for fagkyndige på området. Mikroinjeksjon av embryo som f. eks beskrevet i W083/01783, publisert 26. mai 1983, og W082/04443, publisert 23. desember 1982, kan anvendes. Det syntetiske CRF-analog peptidet utvinnes deretter passende fra dyret ved ekstraksjon fra serum eller lignende.

For kjemiske peptidsynteser er det vanlig å beskytte de labile sidekjedegrupper i de forskjellige aminosyrerester med passende beskyttelsesgrupper som vil forhindre at en kjemisk reaksjon skjer på dette sted inntil gruppen fjernes. Det er også vanlig å beskytte en  $\alpha$ -aminogruppe på en aminosyre eller et fragment mens denne reagerer i karboksylgruppen, med påfølgende selektiv fjerning av den  $\alpha$ -aminobeskyttende gruppe for å tillate at en etterfølgende reaksjon finner sted i denne posisjon. Det er følgelig vanlig, som et trinn i syntesen, at det dannes en mellomproduktforbindelse og som inkluderer at hver aminosyrerest anbringes i ønsket rekkefølge i peptidkjeden, idet flere av disse rester har sidekjedebeskyttende grupper.

I den ovennevnte formel (II) for peptid-mellomproduktet er  $X^1$  enten hydrogen eller en  $\alpha$ -aminobeskyttende gruppe. De  $\alpha$ -aminobeskyttende grupper tenkt på i forbindelse med  $X^1$  er dem som er kjent til å være anvendbare i trinnvis syntese av polypeptidet. Blant gruppene av  $\alpha$ -aminobeskyttende grupper som er

omfattet av  $X^1$  er (1) beskyttende grupper av acyltypen slik som formyl, akrylyl(Acr), benzoyl(Bz) og acetyl(Ac) som foretrukket bare anvendes på N-terminalen, (2) aromatiske beskyttende grupper av uretantypen slik som benzyloksykarbonyl-(Z) og substituert Z, slik som p-klorbenzyloksykarbonyl, p-nitrobenzyloksykarbonyl, p-brombenzyloksykarbonyl, p-metoksybenzyloksykarbonyl, (3) alifatiske uretanbeskyttende grupper slik som t-butyloksykarbonyl(BOC), diisopropylmetoksykarbonyl, isopropylloksykarbonyl, etoksykarbonyl, allyloksykarbonyl, (4) beskyttende grupper av cykloalkyluretantypen slik som fluorenylmetyloksykarbonyl(FMOC), cyklopentyloksykarbonyl, adamantyloksykarbonyl og cykloheksyloksykarbonyl og (5) beskyttende grupper av tiouretantypen slik som fenyltio-karbonyl. Den foretrukne  $\alpha$ -aminobeskyttende gruppe er BOC.

$X^2$  er en beskyttende gruppe for hydroksylgruppen i Thr og Ser og velges foretrukket fra gruppen bestående av acetyl(Ac), benzoyl(Bz), tert-butyl, trifenylmetyl(trityl), tetrahydropyranyl, benzyleter(Bzl) og 2,6-diklorbenzyl (DCB). Den mest foretrukne beskyttelsesgruppe er Bzl.  $X^2$  kan være hydrogen, som betyr at der er ingen beskyttende gruppe på hydroksylgruppen.

$X^3$  er en beskyttende gruppe for guanidingruppen i Arg og er foretrukket valgt fra gruppen bestående av nitro, p-toluen-sulfonyl(Tos), Z, adamantyloksykarbonyl og BOC, eller den er hydrogen. Tos er mest foretrukket.

$X^4$  er hydrogen eller en beskyttende gruppe, foretrukket xantyl(Xan), for amidogruppen i Asn eller Gln.

$X^5$  er hydrogen eller en esterdannende beskyttende gruppe for  $\beta$ - eller  $\alpha$ -karboksylgruppen i Asp eller Glu, foretrukket valgt fra gruppen bestående av benzyl, 2,6-diklorbenzyl, metyl, etyl og t-butylester. OBzl er mest foretrukket.

$X^6$  er hydrogen eller en beskyttende gruppe for sidekjede-aminosubstituenten i Lys. Illustrerende eksempler på passende

sidekjedeaminobeskyttende grupper er Z, 2-klorbenzyloksykarbonyl(2-Cl-Z), Tos, t-amyloksykarbonyl(Aoc), BOC og aromatiske eller alifatiske beskyttende grupper av uretantypen som spesifisert over.

X er hydrogen eller en beskyttende gruppe for imidazol-nitrogenet i His slik som Tos eller 2,4-dinitrofenyl(DNP). Svovelatomet i Met kan om ønsket være beskyttet med oksygen.

Utvelgelsen av sidekjede-aminobeskyttende gruppe er ikke kritisk, unntatt at den bør være en som ikke fjernes under avbeskyttelsen av  $\alpha$ -aminogruppene under syntesen. Således, kan  $\alpha$ -aminobeskyttelsesgruppen og sidekjede-aminobeskyttelsesgruppen ikke være de samme.

X<sup>7</sup> er som nevnt NH<sub>2</sub>, en beskyttende gruppe slik som en ester eller en forankringsbinding anvendt i fastfasesyntese for binding til en fast harpiksbærer, foretrukket en som er representert ved formelen: -NH-benzhydrylamin (BHA) harpiksbærer og -NH-parametylbenzhydrylamin (MBHA) harpiksbærer. Spalting fra en BHA- eller MBHA-harpiks gir direkte CRF-analog amidet. Ved anvendelse av et metylderivat av en slik harpiks kan et metylsubstituert amid dannes som betraktes til å være ekvivalenten av det usubstituerte amid.

I formelen for mellomproduktet er minst en av X, X<sup>1</sup>, X<sup>2</sup>, X<sup>3</sup>, X<sup>4</sup>, X<sup>5</sup> og X<sup>6</sup> en beskyttende gruppe. Den spesielle aminosyre valgt for hver R-gruppe bestemmer om det også vil være en beskyttende gruppe festet som angitt over og som er generelt kjent innen teknikken. Ved utvelgelsen av en spesiell sidekjede-beskyttende gruppe for anvendelse i peptidsyntesen følger man følgende regler: (a) den beskyttende gruppe bør være stabil overfor reagenset og under de reaksjonsbetingelser som er valgt for å fjerne den  $\alpha$ -aminobeskyttende gruppe i hvert syntesetrinn, (b) den beskyttende gruppe bør bibeholde sine beskyttende egenskaper og ikke avspaltes under koblingsbetingelsene, og (c) den sidekjede-beskyttende gruppe må kunne fjernes etter endt syntese og inneholdende den ønskede amino-

syresekvens, under reaksjonsbetingelser som ikke vil endre peptidkjeden.

Som indikert over, kan N-terminalen være noe avkortet uten at dette påvirker den biologiske potens i betydelig grad.

Når peptidene fremstilles ved kjemisk syntese anvendes foretrukket fastfasesyntese som beskrevet av Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85, side 4129 (1964), selv om andre ekvivalente kjente kjemiske synteser også kan anvendes som nevnt i det foregående. Fastfasesyntese begynner vanligvis fra peptidets C-terminale ende ved at en beskyttet  $\alpha$ -aminosyre kobles til en passende harpiks som angitt generelt i US patent nr 4.244.946, meddelt 21. januar 1980, Rivier et al, og som er innlemmet heri som referanse. Et slikt utgangsmaterial for rCRF-analoger kan fremstilles ved at  $\alpha$ -aminobeskyttet Ile festes til en BHA-harpiks.

Ile som er beskyttet med BOC kobles til BHA-harpiksen ved anvendelse av metylenklorid og dimetylformamid (DMF). Etter kobling av BOC-Ile til harpiksbæreren, fjernes den  $\alpha$ -aminobeskyttende gruppe ved anvendelse av trikloreddiksyre (TFA) i metylenklorid, TFA alene eller med HCl i dioksan. Foretrukket anvendes 50 volum% TFA i metylenklorid med 0 - 5 vekt% 1,2-etiditiol. Avbeskyttelsen gjennomføres ved en temperatur mellom 0°C og romtemperatur. Andre standard reagenser for spalting og betingelser for fjerning av spesifikke  $\alpha$ -aminobeskyttende grupper kan anvendes, som beskrevet i Schroder & Lubke, "The Peptides", 1, side 72 - 75 (Academic Press 1965).

Etter fjerning av den  $\alpha$ -aminobeskyttende gruppe i Ile, kobles de gjenværende  $\alpha$ -amino- og sidekjedebeskyttede aminosyrer trinnvis i ønsket rekkefølge for å oppnå mellomproduktforbindelsen som er angitt over. Som et alternativ til å tilsette hver aminosyre separat i syntesen, kan noen av dem kobles til hverandre før tilsetning til fastfasereaktoren. Utvelgelsen av et passende koblingsreagens er kjent innen teknikken. Særlig

passende koblingsreagenser er N,N'-dicykloheksylkarbodiimid (DCCI) og N,N'-diisopropylkarbodiimid (DICI).

De aktiveringsreagenser som anvendes i fastfasesyntesen av peptidene er vel kjent innen peptidkjemien. Eksempler på passende aktiveringsreagenser er karbodiimider slik som N,N'-diisopropylkarbodiimid og N-etyl-N'-(3-dimetylaminopropyl)-karbodiimid. Andre aktiveringsreagenser og deres anvendelse i peptidkobling er beskrevet av Schroder & Lubke, som angitt over, i kapittel III og av Kapoor, J. Phar. Sci., 59, side 1 - 27 (1970).

Hver beskyttet aminosyre eller aminosyresekvens innføres i fastfasereaktoren i et omtrent fire ganger overskudd, og koblingen gjennomføres i et medium av dimetylformamid (DMF): CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1) eller i DMF eller CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> alene. I de tilfeller hvor koblingen gjennomføres manuelt, måler man om koblingsreaksjonen i hvert syntesetrinn er vellykket ved hjelp av ninhydrinreaksjonen som beskrevet av E. Kaiser et al., Anal. Biochem. 34, 595 (1970). I tilfeller hvor ufullstendig kobling forekommer, gjentas koblingsprosedyren før fjerning av den α-aminobeskyttende gruppe og før kobling av den neste aminosyre. Koblingsreaksjonene kan gjennomføres automatisk, som på en Beckman 990 automatisk syntetisator, ved anvendelse av et program som rapportert i Rivier et al., Biopolymers, 1978, 17, side 1927 - 1938.

Etter oppnåelse av den ønskede aminosyresekvens fjernes mellomproduktpeptidet fra harpiksbæreren ved behandling med et reagens slik som flytende hydrogenfluorid, som ikke bare spalter peptidet fra harpiksen, men som også spalter alle de gjenværende sidekjedebeskyttende grupper X, X<sup>2</sup>, X<sup>3</sup>, X<sup>4</sup>, X<sup>5</sup> og X<sup>6</sup> og den α-aminobeskyttende gruppe X<sup>1</sup> for å oppnå peptidet. Ved anvendelse av hydrogenfluorid for spalting, er anisol eller cresol og metyletylsulfid inkludert i reaksjonsbeholderen som rensemidler. Når Met er tilstede i sekvensen, kan den BOC-beskyttende gruppe spaltes med trifluoreddiksyre (TFA)/-

etanditiol før peptidet spaltes fra harpiksen for å eliminere eventuell S-alkylering.

De etterfølgende eksempler viser en foretrukket metode for syntetisering av CRF-analoger ved hjelp av fastfaseteknikken.

#### EKSEMPEL I

Syntesen av [His<sup>20</sup>]-rCRF med formelen: H-Ser-Glu-Glu-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-His-Met-Ala-Arg-Ala-Glu-Gln-Leu-Ala-Gln-Gln-Ala-His-Ser-Asn-Arg-Lys-Leu-Met-Glu-Ile-Ile-NH<sub>2</sub> gjennomføres trinnvis på en MBHA-hydrokloridharpiks, som er tilgjengelig fra Bachem, Inc, med et substitusjonsområde fra 0,1 - 0,5 mmol/g harpiks. Syntesen gjennomføres på en automatisk Beckman 990B peptid-syntetisator ved anvendelse av et passende program, foretrukket som følger:

<u>Trinn</u>	<u>Reagenser og operasjoner</u>	<u>Blandetid i min</u>
1	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -vask - 80 ml (to ganger)	3
2	Metanol (MeOH)-vask - 30 ml (to ganger)	3
3	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -vask - 80 ml (tre ganger)	3
4	50 % TFA pluss 5 % 1,2-etanditiol i CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> - 70 ml (to ganger)	12
5	Isopropanolvask - 80 ml (to ganger)	3
6	TEA 12,5 % i CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> - 70 ml (to ganger)	5
7	MeOH-vask - 40 ml (to ganger)	2
8	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -vask - 80 ml (tre ganger)	3
9	Boc-aminosyre (10 mmol) i 30 ml av enten DMF eller CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , avhengig av oppløseligheten av den spesielle be- skyttede aminosyre, (en gang) pluss DCCI (10 mmol) i CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	30 - 300

Kobling av BOC-Ile resulterer i substitusjon av omtrent 0,35 mmol Ile pr gram harpiks. Alle oppløsningsmidler som anvendes avgasses forsiktig, foretrukket ved gjennomstrømming med inert gass, f. eks helium eller nitrogen, for å sikre fravær av oksygen som uønsket kan oksydere svovelet på Met-resten.

Etter avbeskyttelse og nøytralisering, bygges peptidkjeden trinn for trinn på harpiksen. Generelt anvendes 1 - 2 mmol BOC-beskyttet aminosyre i metylenklorid pr gram harpiks, pluss en ekvivalent 2 molar DCCI i metylenklorid, i to timer. Når BOC-Arg(Tos) kobles, anvendes en blanding av 50 % DMF og metylenklorid. Bzl anvendes som hydroksyl-sidekjedebe-  
skyttelsesgruppen for Ser og Thr. P-nitrofenylester (ONp) anvendes for å aktivere karboksylenden i Asn eller Gln, og BOC-Asn (ONp) kobles f. eks over natten ved anvendelse av en ekvivalent HOBT i en 50 % blanding av DMF og metylenklorid. Amidogruppen i Asn eller Gln beskyttes med Xan når DCCI kobling anvendes i stedet metoden med aktiv ester. 2-Cl-Z anvendes som den beskyttende gruppe for Lys-sidekjeden. Tos anvendes for å beskytte guandiningruppen i Arg og imidazolgruppen i His, og sidekjede-karboksylgruppen i Glu eller Asp beskyttes med OBzl. Etter endt syntese, oppnås følgende sammensetning: BOC-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Pro-Pro-Ile-Ser(Bzl)-Leu-Asp(OBzl)-Leu-Thr(Bzl)-Phe-His(Tos)-Leu-Leu-Arg(Tos)-Glu(OBzl)-Val-Leu-His(Tos)-Met-Ala-Arg(Tos)-Ala-Glu(OBzl)-Gln(Xan)-Leu-Ala-Gln(Xan)-Gln(Xan)-Ala-His(Tos)-Ser(Bzl)-Asn(Xan)-Arg(Tos)-Lys(2-Cl-Z)-Leu-Met-Glu(OBzl)-Ile-Ile-harpiksbærer. Xan kan være delvis eller helt fjernet ved TFA-behandling anvendt for å frigi den  $\alpha$ -aminobeskyttende gruppe.

For å spalte og avbeskytte den oppnådde beskyttede peptidharpiks, behandles denne med 1,5 ml anisol, 0,5 ml metyletylsulfid og 15 ml hydrogenfluorid (HF) pr gram peptidharpiks, først ved -20°C i 20 minutter og deretter ved 0°C i en halv time. Etter fjerning av HF under vakuum, vaskes harpikspeptidet alternativt med tørr dietyleter og kloroform, og peptidene ekstraheres deretter med avgasset 2N vandig eddiksyre og separeres fra harpiksen ved filtrering.

Peptidet renses ved gelpermeasjon etterfulgt av semi-preparativ HPLC som beskrevet i Rivier et al, Peptides: Structure and Biological Function (1979) side 125 - 128, og Rivier et al, J. Chromatography (1983). Kromatografifraksjonene måles

forsiktig med HPLC, og kun de fraksjoner som viser vesentlig renhet samles.

For å undersøke om den nøyaktige sekvens ble oppnådd, hydrolyseres rCRF-analogen i forseglede lufttomme rør inneholdende konstant kokende HCl, 3 µl tioglykol/ml og 1 nmol Nle (som en intern standard) i ni timer ved 140°C. Aminesyreanalyser av hydrolysaten ved anvendelse av en Beckman 121 MB aminosyreanalysator viser følgende aminosyreforhold: Asx(1,8), Thr(0,9), Ser(3,1), Glx(7,9), Pro(2,2), Ala(3,9), Val(0,9), Met(1,8), Ile(2,8), Leu(6,9), Phe(0,8), Lys(1,0), His(2,9) og Arg(2,9), som bekrefter at peptidstrukturen med 41 rester er oppnådd.

#### EKSEMPEL II

Peptidet [His<sup>20</sup>, Nle<sup>21</sup>]-oCRF med formelen: H-Ser-Gln-Glu-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-His-Nle-Thr-Lys-Ala-Asp-Gln-Leu-Ala-Gln-Gln-Ala-His-Ser-Asn-Arg-Lys-Leu-Leu-Asp-Ile-Ala-NH<sub>2</sub> syntetiseres. Utprøving i overensstemmelse med den generelle prosedyre som er angitt i forsøkseksempel A viser at det likeledes stimulerer sekresjonen av ACTH og β-END-LI og gir også en svært signifikant nedsettelse av blodtrykket.

#### EKSEMPEL III

Peptidet [D-Pro<sup>4</sup>, His<sup>20</sup>]-oCRF (4-41) med formelen: H-D-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-His-Met-Thr-Lys-Ala-Asp-Gln-Leu-Ala-Gln-Gln-Ala-His-Ser-Asn-Arg-Lys-Leu-Leu-Asp-Ile-Ala-NH<sub>2</sub> syntetiseres. Utprøving i overensstemmelse med den generelle prosedyre som er angitt i forsøkseksempel A viser at det likeledes stimulerer sekresjonen av ACTH og β-END-LI og gir også en svært signifikant nedsettelse av blodtrykket.

#### FORSØKSEKSEMPEL A

Det syntetiske peptid fra eksemplene I og syntetisk oCRF undersøkes med hensyn på deres virkning på sekresjonen av ACTH og β-endorfin in vitro og også in vivo. Den evnen som synte-

tisk oCRF har til å stimulere sekresjonen av ACTH og  $\beta$ -endorfin i dyrkede rotte-hypofyseceller måles ved anvendelse av prosedyren som generelt er angitt i *Endocrinology*, 91, 562 (1972). Halvparten av maksimal respons observeres ved peptid-konsentrasjoner som er vesentlig mindre enn de konsentrasjoner av syntetisk oCRF på omtrent 250 picomolar som behøves for å oppnå denne respons. In vivo utprøving gjennomføres ved anvendelse av den generelle prosedyre som er angitt i C. Rivier et al, *Science*, 218, 377 (1982), og biologisk styrke konstateres.

FORSØKSEKSEMPEL B

In vitro testing (RAP Analyse)	
Konsentrasjon	Gjennomsnitt (ng ACTH/ml)
Kontroll	2,87
Ovin CRF (1-41) NH <sub>2</sub>	
0,0003 nanomolar	3,22
0,004 nanomolar	4,67
0,02 nanomolar	5,54
0,1 nanomolar	7,28
0,5 nanomolar	9,13
2,5 nanomolar	8,41
[AcPro <sup>4</sup> , His <sup>20</sup> , Nle <sup>21</sup> , Leu <sup>38</sup> ]rCRF(4-41)-NH <sub>2</sub>	
0,0003 nanomolar	2,77
0,001 nanomolar	4,83
0,003 nanomolar	5,85
0,01 nanomolar	7,16
0,03 nanomolar	7,77
0,1 nanomolar	8,62
0,3 nanomolar	8,84
0,1 nanomolar	8,62

Resultatene mates inn i et godkjent datamaskinprogram og viser, etter at ovin (RF(1-41)NH<sub>2</sub>) er satt til å ha en arbitrær verdi lik 1, at analogen som testes og som har His i 20 stilling, har en relativ verdi på 5,68 (konfidensnivå 2,96 - 11,09). Analogen har således en potens som svarer til mere enn omtrent 550 % av den native forbindelse.

CRF-analoger utviser en slik nedsettelse av blodtrykket at de kan være særlig verdifulle for behandling av høyt blodtrykk og også for behandling av pasienter som skal gjennomgå bestemte former for operasjon.

CRF stimulerer inngående hypofyseadrenalkortikalmargen og CRF-analoger vil kunne anvendes for å stimulere denne margens funksjoner i noen pasienttyper med lav endogen glukokortikoidproduksjon. F. eks bør CRF være anvendbar i forbindelse med gjenopprettelse av hypofyseadrenalfunksjonen i pasienter som har mottatt eksogen glukokortikoidterapi hvis hypofyseadrenalkortikalfunksjoner forblir undertrykket.

De fleste andre regulerende peptider er blitt funnet å ha innvirkning på sentralnervesystemet og på mage-tarmkanalen. Fordi ACTH og  $\beta$ -END-sekresjon er "sine qua non" av pattedyrs respons mot stress, var det ikke overraskende at CRF har signifikante virkninger på hjernen som en mediator av kroppens stressrespons. Følgelig, bør CRF også finne anvendelse i forbindelse med modifisering av sinnstilstand, læring og oppførsel hos normale individer og individer med mentale forstyrrelser. Fordi CRF-analoger øker nivåene av ACTH,  $\beta$ -END,  $\beta$ -lipotropin, andre pro-opiomelanokortin-genprodukter og kortikosteron, kan tilførsel derav anvendes for å indusere deres effekt på hjernen og dens periferi, for dermed å innvirke på hukommelse, sinnsstemning, smertesans osv, og mer spesielt våkenhet, depresjon og/eller angst. Ved f.eks. tilførsel derav til ventriklene, økes CRF aktiviteten og bedrer læreeffektiviteten i rotter og kan således virke som et naturlig stimuleringsmiddel.

CRF-analoger bør også kunne anvendes for å øke blodstrømmen til mage- og tarmkanalen i pattedyr, særlig mennesker og andre pattedyr. Alle CRF-relaterte peptider er blitt vist å utvide den mesenteriale vaskulære bane.  $\alpha$ CRF indikerer også magesyreproduksjon og CRF-analoger forventes også å være effektive i behandlingen av gastrisk ulcus ved å redusere

mageproduksjon og/eller inhibere mage-tarmkanalfunksjoner i pattedyr.

CRF-analoger eller de ikke-giftige addisjonssalter derav, kombinert med en farmasøytisk eller veterinærmessig tålbare bærer for å danne et farmasøytisk preparat, kan tilføres til pattedyr, omfattende mennesker, enten intravenøst, subkutant, intramuskulært, perkutant, f. eks. intranasalt, intracerebrospinalt eller oralt. Peptidene bør ha en renhetsgrad på minst 90 % og foretrukket bør de ha en renhetsgrad på minst 98 %, men lavere renhetsgrader er imidlertid effektive og kan godt anvendes i pattedyr forskjellig fra mennesker. Denne renhet betyr at det tilsiktede peptid utgjør den angitte vekt% av alle like peptider og peptidfragmenter som er til stede. Tilførsel til mennesker kan gjennomføres av en lege for å nedsette blodtrykket eller for å stimulere endogen glukokortikoidproduksjon. Den påkrevde dose vil variere med den tilstand som behandles, med tilstandens alvorlighet og med varigheten av ønsket behandling.

Peptidene kan også anvendes for å evaluere hypotalmisk hypofyseadrenalfunksjon i pattedyr med antatt endokrin- eller sentralnervesystem-patologi ved passende tilførsel derav etterfulgt av måling av kroppsfunksjoner. Tilførselen kan f.eks. anvendes som et diagnostisk hjelpemiddel for å evaluere Cushings sykdom og emosjonelle forstyrrelser, slik som depresjon.

Slike peptider tilføres ofte i form av farmasøytisk eller veterinærmessig tålbare ikke-giftige salter, slik som syreaddisjonssalter eller metallkomplekser, f. eks. med sink, jern, kalsium, barium, magnesium, aluminium eller lignende (som betraktes som addisjonssalter i oppfinnelsens sammenheng). Eksempler på slike syreaddisjonssalter er hydroklorid, hydrobromid, sulfat, fosfat, tannat, oksalat, fumarat, glukonat, alginat, maleat, acetat, citrat, benzoat, succinat, malat, askorbat, tartrat, eller lignende. Dersom den aktive bestanddel skal tilføres i tablettform, kan tablettene

inneholde et bindemiddel, slik som tragantgummi, maisstivelse eller gelatin, et oppløsningsmiddel, slik som alginsyre, og et smøremiddel slik som magnesiumstearat. Dersom tilførsel i flytende form er ønsket, kan søtningsmidler og/eller smaks-tilsetninger tilsettes, og intravenøs tilførsel i isoton saltløsning, fosfatbufferoppløsninger eller lignende kan gjennomføres.

Peptidene bør tilføres under legetilsyn, og farmasøytiske preparater vil vanligvis inneholde peptidet sammen med en vanlig anvendt farmasøytisk eller veterinærmessig tålbart bærer. Dosen vil vanligvis være fra 1 - 200 µg peptid pr kg kroppsvekt til vertsdyret. I enkelte tilfeller, kan behandling av individer med disse peptider gjennomføres i stedet for tilførsel av ACTH eller kortikosteroider, og ved slike tilfeller kan en dose så lav som omtrent 10 ng/kg kroppsvekt anvendes. Som anvendt heri, er alle temperaturer i °C og alle forhold er i volumdeler. Prosentdeler av flytende material er også i volumdeler.

#### **PATENTKRAV**

1. Analogifremgangsmåte for fremstilling av terapeutisk aktive peptider med formel (I):

H-Ser-Glu-Glu-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-His-R<sub>21</sub>-Ala-Arg-Ala-Glu-Gln-Leu-Ala-Gln-Gln-Ala-His-Ser-Asn-Arg-Lys-Leu-Met-Glu-Ile-Ile-NH<sub>2</sub>, hvor R<sub>21</sub> er Met eller Nle, med den betingelse at de tre aminosyrerester i N-terminalen kan utelates og at D-Pro kan erstatte Pro i N-terminalen, eller et ikke-giftig addisjonssalt derav,

k a r a k t e r i s e r t v e d at individuelle aminosyrer eller korte peptider kobles til å danne et peptidmellomprodukt med minst en beskyttende gruppe og med formel (II) eller en versjon av denne som er forkortet i N-terminalen:

X<sup>1</sup>-Ser(X<sup>2</sup>)-Glu(X<sup>5</sup>)-Glu(X<sup>5</sup>)-Pro-Pro-Ile-Ser(X<sup>2</sup>)-Leu-Asp(X<sup>5</sup>)-Leu-Thr(X<sup>2</sup>)-Phe-His(X)-Leu-Leu-Arg(X<sup>3</sup>)-Glu(X<sup>5</sup>)-Val-Leu-His(X)-R<sub>21</sub>-

Ala-Arg(X<sup>3</sup>)-Ala-Glu(X<sup>5</sup>)-Gln(X<sup>4</sup>)-Leu-Ala-Gln(X<sup>4</sup>)-Gln(X<sup>4</sup>)-Ala-His(X)-Ser(X<sup>2</sup>)-Asn(X<sup>4</sup>)-Arg(X<sup>3</sup>)-Lys(X<sup>6</sup>)-Leu-Met-Glu(X<sup>5</sup>)-Ile-Ile-X<sup>7</sup> hvor R-gruppen er som angitt over, X, X<sup>1</sup>, X<sup>2</sup>, X<sup>3</sup>, X<sup>4</sup>, X<sup>5</sup> og X<sup>6</sup> er hver enten hydrogen eller en beskyttende gruppe og X<sup>7</sup> er enten en beskyttende gruppe eller NH<sub>2</sub> eller en forankringsbinding til en harpiksbærer, den eller de beskyttelsesgrupper og forankringsbindingen avspaltes fra nevnte peptid-mellomprodukt med formel (II) og om ønsket, omdannes det oppnådde peptid til et ikke-giftig addisjonssalt derav.

2. Fremgangsmåte som angitt i krav 1 for fremstilling av peptidet [His<sup>20</sup>]-rCRF, k a r a k t e r i s e r t v e d at peptidet fremstilles fra de tilsvarende utgangsforsbindelser.