(19) SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 962584 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS**
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE PUBLIC

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 962584

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
C07K 7/06
C07K 7/02
C07K 5/10
C07K 5/08
C07K 5/02

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **22.12.1994**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **20.06.1996**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **20.06.1996**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - Internationell ansökan - International application **22.12.1994 PCT/DK1994/000485**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

23.12.1993 DK 1439/93 28.01.1994 DK 0121/94
14.10.1994 DK 1191/94

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • **Novo Nordisk A/S,** Novo Alle, 2880 Bagsvaerd, TANSKA, (DK)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • **Johansen, Nils Langeland,** Danmark, TANSKA, (DK)
2 • **Lau, Jesper,** Danmark, TANSKA, (DK)
3 • **Madsen, Kjeld,** Danmark, TANSKA, (DK)
4 • **Lundt, Behrend Friedrich,** Danmark, TANSKA, (DK)
5 • **Thoegersen, Henning,** Danmark, TANSKA, (DK)
6 • **Hansen, Birgit Sehested,** Danmark, TANSKA, (DK)
7 • **Peschke, Bernd,** Danmark, TANSKA, (DK)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Berggren Oy Ab, Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention
Kasvuhormonia vapauttavia ominaisuuksia sisältäviä yhdisteitä
Föreningar med tillväxthormonfrigörande egenskaper

L3

Kasvuhormonia vapauttavia ominaisuuksia sisältäviä yhdisteitä - Föreningar med tillväxthormonfrigörande egenskaper

Keksinnön ala

Keksintö liittyy uusiin peptidijohdannaisiin, näitä sisältäviin koostumuksiin ja niiden käyttöön kasvuhormonin puutteesta johtuvien sairauksien hoitoon.

Keksinnön tausta

Kasvuhormoni on hormoni, joka stimuloi kaikkien kasvukykyisten kudosten kasvua. Kasvuhormonilla tiedetään lisäksi olevan useita vaikutuksia aineenvaihduntailmiöihin, se aiheuttaa esimerkiksi proteiinisynteesin ja vapaiden rasvahappojen mobilisaation stimuloitumista ja saa aikaan energiametabolian siirtymisen hiilihydraattimetaboliasta rasvahappometaboliaan. Kasvuhormonin puute voi johtaa useisiin lääketieteen tuntemiin vaikeisiin sairauksiin, kuten esimerkiksi kääpiökasvuisuuteen.

Kasvuhormonia vapautuu aivolisäkkeestä. Tätä vapautuu joko suoraan tai epäsuorasti useiden hormonien ja välittäjäaineiden tarkan ohjauksen alaisuudessa. Kasvuhormonia vapauttava hormoni (GHRH) voi stimuloida kasvuhormonin vapautumista ja somatostatiini inhiboida sitä. Kummassakin tapauksessa hormonit vapautuvat hypotalamuksesta mutta niiden vaikutus välittyy pääasiassa aivolisäkkeessä sijaitsevien spesifisten reseptorien kautta. On myös kuvattu muita yhdisteitä, jotka stimuloivat kasvuhormonin vapautumista aivolisäkkeestä. Esimerkiksi arginiini, L-3,4-dihydroksifenyylialaniini (L-Dopa), glukagoni, vasopressiini, PACAP (aivolisäkkeen adenylyylisyklaasia aktivoiva peptidi), muskariinireseptoriagonistit ja synteettinen heksapeptidi (GHRP, kasvuhormonia vapauttava peptidi) vapauttavat endogeenista kasvuhormonia joko vaikuttamalla suoraan aivolisäkkeeseen tai vaikuttamal-

la GHRH:n ja/tai somatostatiinin vapautumiseen hypotalamuksesta.

Sairauksissa tai sairaustiloissa, joissa on haluttua saada kohotettua kasvuhormonin määrää, ei kasvuhormonia kannata antaa millään muulla antamismenetelmällä kuin annostelemalla sitä parenteraalisesti, koska kasvuhormoni on luonteeltaan proteiini. Lisäksi muut suoraan vaikuttavat luonnolliset kasvuhormonia vapauttavat yhdisteet, esimerkiksi GHRH ja PACAP, ovat pitkähköjä polypeptidejä, mistä syystä niitä ei kannata annostella oraalisesti.

Aikaisemmin on esimerkiksi julkaisuissa EP 18 072, EP 83 864, WO 89/07 110, WO 89/01 711, WO 89/10 933, WO 88/9780, WO 83/02 272, WO 91/18 016, WO 92/01 711 ja WO 93/04 081 ehdotettu lyhyehköjen peptidien käyttöä kasvuhormonin pitoisuuksien kohottamiseksi nisäkkäissä.

Kasvuhormonia vapauttavien peptidien tai peptidijohdannaisten koostumuksella on tärkeä merkitys niiden kasvuhormonin vapauttamistehokkuudelle sekä niiden biologiselle hyötyosuudelle. Tästä syystä tämän keksinnön kohteena on saattaa käyttöön peptidejä, joissa on kasvuhormonia vapauttavia ominaisuuksia ja jotka ovat ominaisuuksiltaan tämän tyyppisten tunnettujen peptidien ominaisuuksia parempia.

<u>Keksinnön yhteenveto</u>

Edellisen perusteella tämä keksintö liittyy yhdisteeseen, jolla on yleinen kaava I:

$$A - B - C - D(- E)_p \qquad I$$

jossa p on 0 tai 1;

A on vety tai $R^1-(CH_2)_q-(X)_r-(CH_2)_s-CO-$, jossa

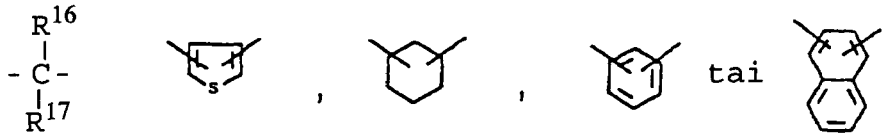
q on 0 tai alueelta 1 - 5 oleva kokonaisluku;

r on 0 tai 1;

s on 0 tai alueelta 1 - 5 oleva kokonaisluku;

R^1 on vety, imidatsolyyli, guanidiini, piperatsiini, morfoliini, piperidiini tai $N(R^2)$-R^3, jossa R^2 ja R^3 ovat kumpikin toisistaan riippumatta vety tai alempi alkyyli, joka on mahdollisesti substituoitu yhdellä tai useammalla hydroksyyli-, pyridinyyli- tai furanyyliryhmällä; ja

X, silloin kun r on 1, on -NH-, $-CH_2-$, -CH=CH-,



jossa R^{16} ja R^{17} ovat kumpikin toisistaan riippumatta vety tai alempialkyyli;

B on $(G)_t$-$(H)_u$, jossa

t on 0 tai 1;

u on 0 tai 1;

G ja H ovat aminohapporyhmiä, jotka ovat luonnossa esiintyviä L-aminohappoja tai niiden vastaavia D-isomeerejä, tai aminohappoja, joita ei esiinny luonnossa, kuten 1,4-diaminovoihappo, aminoisovoihappo, 1,3-diaminopropionihappo, 4-aminofenyylialaniini, 3-pyridyylialaniini, 1,2,3,4-tetrahydroisokinoliini-3-karboksyylihappo, 1,2,3,4-tetrahydronorharmaani-3-karboksyylihappo, N-metyyliantraniilihappo, antraniilihappo, N-bentsyyliglysiini, 3-aminometyylibentsoehappo, 3-amino-3-metyylibutaanihappo, sarkosiini, nipekotiinihappo tai isonipekotiinihappo;

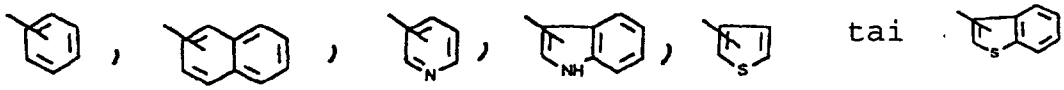
ja jossa silloin, kun sekä t että u ovat 1, on G:n ja H:n välisen amidisidoksen tilalla mahdollisesti ryhmä:

$-Y-\overset{R^{18}}{\overset{|}{N}}-$, jossa Y on >C=O tai $\overset{|}{CH_2}$, ja R^{18} on vety, alempialkyyli tai alempiaralkyyli;

C on D-aminohappo, jolla on kaava $-NH-CH((CH_2)_w-R^4)-CO-$, jossa

w on 0, 1 tai 2; ja

R^4 on



joista kukin on mahdollisesti substituoitu halogeenilla, alempialkyylillä, alempialkyylioksilla, alempialkyyliaminolla, aminolla tai hydroksilla;

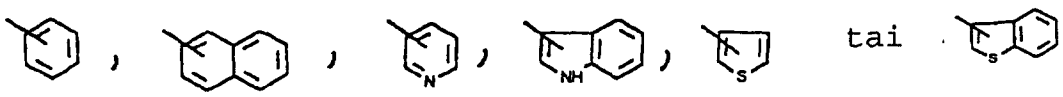
D, silloin kun p on 1, on D-aminohappo, jolla on kaava $-NH-CH((CH_2)_k-R^5)-CO-$, tai silloin kun p on 0, niin D on $-NH-CH((CH_2)_l-R^5)-CH_2-R^6$ tai $-NH-CH((CH_2)_m-R^5)-CO-R^6$, jossa

k on 0, 1 tai 2;

l on 0, 1 tai 2;

m on 0, 1 tai 2;

R^5 on:



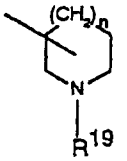
joista kukin on mahdollisesti substituoitu halogeenilla, alkyylilla, alkyylioksilla, aminolla tai hydroksilla; ja

R^6 on piperatsiini, morfoliini, piperidiini, -OH tai $-N(R^7)-R^8$, jossa R^7 ja R^8 ovat kumpikin toisistaan riippumatta vety tai alempialkyyli;

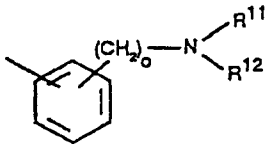
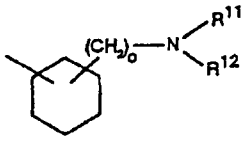
E, silloin kun p on 1, on $-NH-CH(R^{10})-(CH_2)_v-R^9$, jossa

v on 0 tai alueelta 1 - 8 oleva kokonaisluku;

R^9 on vety, imidatsolyyli, guanidiini, piperatsiini, morfoliini, piperidiini,

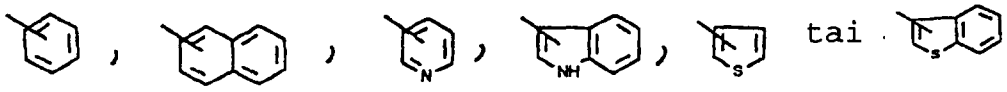


jossa n on 0, 1 tai 2, ja R^{19} on vety tai alempialkyyli,

 tai 

jossa o on alueelta 1 - 3 oleva kokonaisluku,

tai $N(R^{11})-R^{12}$, jossa R^{11} ja R^{12} ovat kumpikin toisistaan riippumatta vety tai alempialkyyli, tai



joista kukin on mahdollisesti substituoitu halogeenilla, alkyylilla, alkyylioksilla, aminolla, alkyyliaminolla, hydroksilla tai Amadorin toisiintumistuotteella, joka on peräisin aminoryhmästä ja heksapyranoosista tai heksapyranosyyli-heksapyranoosista

ja

R^{10}, silloin kun p on 1, on -H, -COOH, $-CH_2-R^{13}$, $-CO-R^{13}$ tai $-CH_2-OH$, jossa

R^{13} on piperatsiini, morfoliini, piperidiini, -OH tai $-N(R^{14})-R^{15}$, jossa R^{14} ja R^{15} ovat kumpikin toisistaan riippumatta vety tai alempialkyyli;

B:n ja C:n välisen amidisidoksen tilalla, tai silloin kun t ja u ovat kumpikin 0, A:n ja C:n välisen amidisidoksen tilalla, on mahdollisesti ryhmä

$-Y-\overset{R^{18}}{\underset{|}{N}}-$, jossa Y on >C=O tai $\overset{|}{\underset{|}{CH_2}}$, ja R^{18} on vety, alempialkyyli tai alempiaralkyyli,

tai, silloin kun p on 1, niin D:n ja E:n välisen amidisidoksen tilalla on mahdollisesti ryhmä

$-Y-\overset{R^{18}}{\underset{|}{N}}-$, jossa Y ja R^{18} ovat edellä olevan kuvauksen mukaiset;

tai tämän farmaseuttisesti hyväksyttävä suola.

Kaavan I mukaisten peptidijohdannaisten arvellaan olevan aikaisempaa vastustuskykyisempiä entsyymien aikaansaamaa proteolyyttistä pilkkoutumista vastaan siitä syystä, että nämä peptidisekvenssit sisältävät kaksi vierekkäistä D-aminohappoa yhdistettynä mahdollisesti siihen, että amidisidoksen (-CO-NH-) tilalla käytetään edellä kuvatulla tavalla ryhmää $-Y-\overset{R^{18}}{\underset{|}{N}}-$, jollainen on esimerkiksi aminometyleeni ($-CH_2-NH-$), ja/tai peptidin N- tai C-terminaalista pään modifiointia. Sen, että tämän keksinnön mukaiset peptidijohdannaiset ovat aikaisempaa vastustuskykyisempiä proteolyyttiselle pilkkoutumiselle, ja sen, että ne ovat kooltaan aikaisempaa pienempiä, odotetaan parantavan niiden biologis-

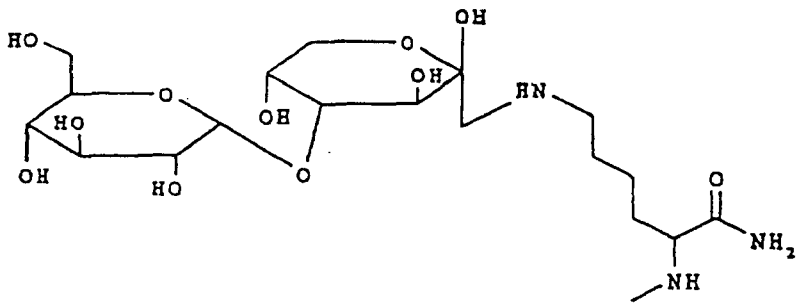
ta hyötyosuutta aikaisemmassa ammattikirjallisuudessa ehdotettujen peptidien biologiseen hyötyosuuteen verrattuna.

Tässä yhteydessä termi "alempialkyyli" tarkoittaa 1 - 6-hiiliatomista alkyyliä, erityisesti metyyliä, etyyliä, propyylia, isopropyylia, butyylia, pentyyliä tai heksyyliä. Termiin "halogeeni" on tarkoitus sisältyä Cl, F, Br ja I. Termeissä "alempialkyylioksi", "alempiaralkyyli" ja "alempialkyyliamino" on alempialkyyliosalla edellä kuvattu merkitys.

Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus

Kaavan I mukaisen yhdisteen edullisessa sovellutusmuodossa p on 1. Kaavan I mukaisen yhdisteen toisessa edullisessa sovellutusmuodossa A on vety tai vaihtoehtoisesti $R^1-(CH_2)_q-(X)_r-(CH_2)_s-CO-$, jossa R^1 on 3-imidatsolyyli, q on 2, r on 0 ja s on 0; tai jossa R^1 on NH_2, q on 1, r on 1, X on disubstituoitu bentseeni, joka on edullisesti substituoitu 1- ja 3-asemista, ja s on 0; tai jossa R^1 on NH_2, q on 1, r on 1, X on disubstituoitu tiofeeni, joka on edullisesti substituoitu 3- ja 2-asemista, ja S on 0. Silloin kun t on 1, niin kaavan I mukaisen yhdisteen sisältämä G on edullisesti Ala, Gly, Aib, sarkosiini, nipekotiinihappo tai isonipekotiinihappo. Silloin kun u on 1, niin H on edullisesti His, Phe, Tic, Phe(4-NH_2), 3-Pyal, Gly, Ala, Sar, Pro, Tyr, Arg, Orn, 3-aminometyylibentsoehappo tai D-Phe. Kaavan I mukaisen yhdisteen sisältämä C on edullisesti D-2-naftyylialaniini (D-2Nal), D-1-naftyylialaniini (D-1Nal), D-Phe tai D-Trp. Kaavan I mukaisen yhdisteen sisältämä D on edullisesti D-Phe, D-1Nal, D-2Nal, D-Trp, 3-Pyal, D-Phe(4F), D-Tyr tai Phe-NH_2.

Kaavan I mukaisen yhdisteen sisältämä E on edullisesti Lys-NH_2, NH-(2-(1-piperatsiini)etyyli), NH-(2-(1-morfoliini)-propyyli), NH-(2-aminoetyyli), NH-(4-aminometyylibentsyyli), NH-(bentsyyli), Lys-OH, NH-(1-hydroksi-6-amino-2S-heksyyli), NH-(2-(1-metyyli-2-pyrrolidinyyli)etyyli), tai



Kaavan I mukaisen yhdisteen sisältämä R^4 on edullisesti 2-naftyyli. R^5 on edullisesti fenyyli. v on edullisesti 2 - 6, ja R^9 on NH_2, morfoliinietyyli, morfoliinipropyyli tai (1-metyylipyrrolidinyyli)etyyli. R^{10} on edullisesti -COOH, $-CH_2-OH$, -H, $-CONH_2$ tai - $CON(CH_3)_2$.

Esimerkkejä tämän keksinnön mukaisista erityisistä yhdisteistä ovat

H-Ala-His$\psi(CH_2NH)$D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

H-Ala-Ala-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

H-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

(3-(4-imidatsolyyli)propionyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

H-D-Lys-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

H-5Apent-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

H-D-Ala-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

H-5Apent-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

(n-propyyli)-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

H-Ala-3Pyal-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

H-Ala-Phe(4-NH_2)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

H-D-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

(2-(4-imidatsolyyli)asetyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

(3-(4-imidatsolyyli)akryloyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

(3-aminometyylibentsoyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

(3-aminofenyyliasetyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

(4-aminofenyyliasetyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

(3-aminokrotonoyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

(4-piperidiini-karboksyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-NH_2

(H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-NH)heksaani

6-(H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-NH)heksyyliamiini

5-(H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-NH)pentyylimiini

H-Ala-His-D-2Nal-D-Pheψ(CH_2NH)Lys-NH_2

H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-OH

(2S)-(H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-NH)-6-aminoheksanoli

(2-(H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-NH)etyyli)bentseeni

2-(H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-NH)etyyliamiini

4-((H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-NH)metyyli)bentsyyliamiini

H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-Lys(maltosyyli)-NH_2

H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-Phe-NH_2

H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-D-Phe-NH_2

H-Ala-His-D-Phe-D-Phe-Lys-NH_2

H-Ala-His-D-Trp-D-Phe-Lys-NH_2

H-His-D-2Nal-D-Trp-Lys-NH_2

H-Ala-His-D-1Nal-D-Phe-Lys-NH_2

H-Ala-Phe-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-Lys(maltosyyli)-NH_2

(2R)-(H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH)-3fenyylipropyyliamiini

H-Ala-N-Me-(2-aminobentsoyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

(3-(metyyliaminometyyli)bentsoyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

(4-(aminometyyli)bentsoyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

H-His-Ala-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

4-(H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-NH)butyyliamiini

3-(H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-NH)propyyliamiini

(3-(dimetyyliaminometyyli)bentsoyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

(3-amino-3-metyylibutanoyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

(3-aminometyylibentsoyyli)-D-hPhe-D-Phe-Lys-NH_2

(3-aminometyylibentsoyyli)ψ(CH_2NH)D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

(3-aminometyylibentsoyyli)-D-2Nal-D-hPhe-Lys-NH_2

(3-amino-3-metyylibutanoyyli)-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

(3-aminometyylibentsoyyli)-D-2Nal-N-Bzl-Gly-Lys-NH_2

(2S)-(3-aminometyylibentsoyyli)ψ(CH_2NH)-D-2Nal-D-Phe-NH)-6-aminoheksanoli

(2S)-((3-aminometyylibentsoyyli)-D-2Nal-D-Phe-NH)-6-aminoheksanoli

(3-aminometyylibentsoyyli)-D-2Nal-D-Thial-Lys-NH_2

(2S)-(H-Aib-Hisψ(CH_2NH)-D-2Nal-D-Phe-NH)-6-aminoheksanoli

(3-aminometyylibentsoyyli)-D-2Nal-D-3Pyal-Lys-NH_2

(3-aminometyylibentsoyyli)-D-2Nal-D-Phe(4-F)-Lys-NH_2

(3-aminometyylibentsoyyli)-D-2Nal-D-Phe(4-OMe)-Lys-NH_2

(2-aminometyylifenyyliasetyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

(2-aminometyylibentsoyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

2-(H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-NH)-(4-pyridyyli)etaani

H-Aib-Phe-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

2-(H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-NH)-(1-metyyli-2-pyrrolidinyyli)-etaani

2-(H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-NH)-(4-pyridyyli)etaani

H-Aib-Hisψ(CH_2NH)-D-2Nal-D-Phe-Lys-OH

(3-aminometyylibentsoyyli)-D-2Nal-N-Me-D-Phe-Lys-NH_2

H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-Gly-NH_2

H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-Ala-NH_2

H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-Orn-NH_2

(5-aminometyylitienyyli-2-karbonyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-D-Lys-NH_2

H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-Dab-NH_2

H-Aib-His-D-2Nal-D-Pheψ(CH_2NH)-Lys-NH_2

H-Aib-His-N-Me-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-N-Me-Lys-NH_2

(3-aminometyylitienyyli-2-karbonyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

H-Aib-His-D-2Nal-N-Me-D-Phe-Lys-NH_2

H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-N$(Me)_2$

(3R)-piperidiinikarbonyyli-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

(3S)-piperidiinikarbonyyli-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

(3-aminometyylibentsoyyli)-D-1Nal-D-Phe-Lys-NH_2

H-Aib-His-D-2Nal-D-Trp-Lys-NH_2

(Furfuryyli)-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

(2-pyridyylimetyyli)-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

H-Aib-(3-aminometyylibentsoyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

H-Aib-3Pyal-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

(3S)-piperidiinikarbonyyli-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

(3R)-piperidiinikarbonyyli-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

(2-(H-Aib-His-D-2Nal-NH)etyyli)bentseeni

N,N-di(2R-hydroksipropyyli)-(3-aminometyylibentsoyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

(2R-hydroksipropyyli)-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

(3-aminometyylibentsoyyli)-D-2Nal-D-Phe$\psi(CH_2NH)$Lys-NH_2

(3-aminometyylibentsoyyli)-N-Me-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

(3-aminometyylibentsoyyli)-D-2Nal-D-Phe-N-Me-Lys-NH_2

H-D-Thr-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

H-Aib-His-D-2Nal-N-(fenetyyli)-Gly-Lys-NH_2

(3-aminometyylibentsoyyli)-D-2Nal-N-(fenetyyli)-Gly-Lys-NH_2

H-Hyp-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

H-Aib-His-N-Me-D-2Nal-N-(fenetyyli)-Gly-Lys-NH_2

H-Aib-His-N-Me-D-2Nal-N-Me-D-Phe-Lys-NH_2

H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe$\psi(CH_2N(Me))$Lys-NH_2

3-(H-Aib-His-D-2Nal-N-Me-D-Phe-NH)morfoliinipropaani

2-(H-Aib-His-D-2Nal-N-Me-D-Phe-NH)-(1-metyyli-2-pyrrolidinyyli)etaani

(3R)-piperidiinikarbonyyli-N-Me-D-2Nal-N-Me-D-Phe-Lys-NH_2

3-((aminometyylibentsoyyli)-D-2Nal-N-Me-D-Phe-NH)morfoliinipropaani

2-(H-Aib-His-N-Me-D-2Nal-N-Me-D-Phe-NH)-(1-metyyli-2-pyrrolidinyyli)etaani

2-(3R)-piperidiinikarbonyyli-N-Me-D-2Nal-N-Me-D-Phe-NH)-(1-metyyli-2-pyrrolidinyyli)etaani

2-(3-aminometyylibentsoyyli)-N-Me-D-2Nal-N-Me-D-Phe-NH)-(1-metyyli-2-pyrrolidinyyli)etaani

3-(H-Aib-His-N-Me-D-2Nal-N-Me-D-Phe-NH)morfoliinipropaani

3-((3R)-piperidiinikarbonyyli-N-Me-D-2Nal-N-Me-D-Phe-NH)-morfoliinipropaani

3-((3-aminometyylibentsoyyli)-N-Me-D-2Nal-N-Me-D-Phe-NH)-morfoliinipropaani

H-Aib-His-D-2Nal-N-Me-D-Phe-Hyp-NH_2

2-((3-aminometyylibentsoyyli)-D-2Nal-N-Me-D-Phe-NH)-(1-metyyli-2-pyrrolidinyyli)etaani

2-((3R)piperidiinikarbonyyli-D-2Nal-N-Me-D-Phe-NH)-(1-metyyli-2-pyrrolidinyyli)etaani

Lyhenteet:

D-2Nal = D-2-naftyylialaniini
5Apent = 5-aminopentaanihappo
3Pyal = 3-pyridyylialaniini
Aib = H-aminoisovoihappo
Thial = tienyylialaniini
hPhe = homo-fenyylialaniini
N-Bzl-Gly = N-bentsyyliglysiini
4-F = 4-fluori
4-OMe = 4-metoksi
Orn = ornitiini
Dab = 2,4-diaminovoihappo
Hyp = hydroksiproliini
Tic = 1,2,3,4-tetrahydroisokinoliini-3-karboksyylihappo

Kaavan I mukaisia yhdisteitä voidaan valmistaa tavanomaisilla peptidien synteesin liuosmenetelmillä tai kiinteän faasin menetelmillä. Peptidejä voidaan syntetoida kiinteässä faasissa esimerkiksi olennaisesti Steward'in ja Young'in, Solid Phase Peptide Synthesis 2nd. Ed., Rockford, Illinois, USA, 1976, kuvaamalla tavalla. Peptidejä voidaan syntetoida liuoksessa esimerkiksi olennaisesti Bodansky, et al.':n, Peptide Synthesis 2nd. Ed., New York, New York, USA, 1976, kuvaamalla tavalla.

Aminometyleeni voidaan liittää amidisidosta korvaavaksi sidokseksi menetelmällä, jonka ovat kuvanneet Sasaki, Y. ja Coy, D.H., Peptides 8(1) (1987) 119 - 121. Mono- tai diheksapyranoosijohdannaisilla varustettuja aminohapporyhmiä sisältäviä peptidijohdannaisia voidaan valmistaa käyttämällä Amadorin toisiintumista olennaisesti menetelmän avulla, jonka ovat kuvanneet Albert, R., et al., Life Sciences 53 (1993) 517 - 525. Esimerkkejä sopivista mono- tai diheksapyranooseista ovat glukoosi, galaktoosi, maltoosi, laktoosi

tai sellobiosi. Synteesin lähtömateriaaleina käytetyt johdannaiset voivat olla joko kaupallisesti hankittuja ja tarvittaessa varustettuna sopivilla suojaavilla ryhmillä tai yleisen kaavan I sisältävän "A"-ryhmän valmistamiseen käytetyt lähtömateriaalit voidaan valmistaa tunnetuilla menetelmillä ja mahdollisesti suojata sinänsä tunnetulla tavalla.

Kaavan I mukaisten yhdisteiden farmaseuttisesti hyväksyttäviä happoadditiosuoloja ovat suolat, jotka valmistetaan saattamalla peptidi reagoimaan epäorgaanisen tai orgaanisen hapon, kuten kloorivety-, bromivety-, rikki-, etikka-, fosfori-, maito-, maleiini-, ftaali-, sitruuna-, glutaari-, glukoni-, metaanisulfoni-, salisyyli-, meripihka-, viini-, tolueenisulfoni-, trifluorietikka-, sulfaami- ja fumaarihapon, kanssa.

Vielä yhdessä kohteessa tämä keksintö liittyy farmaseuttiseen koostumukseen, joka sisältää aktiivisena ainesosana yleisen kaavan I mukaista yhdistettä tai tämän farmaseuttisesti hyväksyttävää suolaa sekä farmaseuttisesti hyväksyttävää kantaja-ainetta tai laimenninta.

Tämän keksinnön mukaista yhdistettä sisältäviä farmaseuttisia koostumuksia voidaan valmistaa tavanomaisin menetelmin, esimerkiksi teoksessa Remington's Pharmaceutical Sciences, 1985, kuvatulla tavalla. Koostumuksia voidaan valmistaa tavanomaisina lääkemuotoina, esimerkiksi kapseleina, tabletteina, aerosoleina, liuoksina, suspensioina tai paikalliskäyttöön tarkoitettuina valmisteina.

Käytetty farmaseuttinen kantaja-aine tai laimennin voi olla tavanomainen kiinteä tai nestemäinen kantaja-aine. Esimerkkejä kiinteistä kantaja-aineista ovat laktoosi, terra alba, sakkaroosi, syklodekstriini, talkki, gelatiini, agar, pektiini, arabikumi, magnesiumstearaatti, steariinihappo tai selluloosan alempialkyyliesterit. Esimerkkejä nestemäisistä kantaja-aineista ovat siirappi, maapähkinäöljy, oliiviöljy,

fosfolipidit, rasvahapot, rasvahappoamiinit, polyoksietyleeni ja vesi.

Samalla tavoin kantaja-aine tai laimennin voi sisältää mitä tahansa tällä alalla tunnettua lääkeaineen pitkään vapautumiseen tarvittavaa materiaalia, kuten glyseryylimonostearaattia tai glyseryylidistearaattia joko yksinään tai yhdistettynä vahaan.

Jos oraaliseen antamiseen käytetään kiinteää kantaja-ainetta, niin preparaatti voidaan valmistaa tableteiksi, valmistaa jauheen tai rakeiden muodossa kovaan gelatiinikapseliin tai se voi olla annostabletin tai pillerin muodossa. Kiinteän kantaja-aineen määrä voi vaihdella laajalla alueella, mutta se on tavallisesti noin 25 mg - noin 1 g.

Tyypillinen tabletti, joka voidaan valmistaa tavanomaisilla tabletointimenetelmillä, voi sisältää:

<u>Ydin:</u>

Aktiivista yhdistettä (vapaana yhdisteenä tai tämän suolana)	100 mg
Kolloidista piidioksidia (Aerosil)	1,5 mg
Selluloosa, mikrokiteinen (Avicel)	70 mg
Modifioitua selluloosakumia (Ac-Di-Sol)	7,5 mg
Magnesiumstearaattia	

<u>Päällyste:</u>

HPMC noin	9 mg
*Mywacett 9-40 T noin	0,9 mg

*asyloitu monoglyseridi, joka käytetään pehmittimenä kalvopäällystystä varten.

Nestemäistä kantaja-ainetta käytettäessä voi valmiste olla siirapin, emulsion, pehmeän gelatiinikapselin tai steriilin injektionesteen, kuten vesipitoisen tai ei-vesipitoisen nestemäisen suspension tai liuoksen, muodossa.

Nasaalista annostelua varten voi preparaatti sisältää sen käyttämiseksi aerosolina kaavan I mukaista yhdistettä liuotettuna tai suspendoituna nestemäiseen kantaja-aineeseen, erityisesti vesipitoiseen kantaja-aineeseen. Kantaja-aine voi sisältää lisäaineita, kuten solubilisointiaineita, esimerkiksi propyleeniglykolia, pinta-aktiivisia aineita, kuten sappihapposuoloja tai polyoksietyleeniylempialkoholieettereitä, absorboitumista tehostavia aineita, kuten lesitiiniä (fosfatidyylikoliinia) tai syklodekstriiniä, tai säilyteaineita, kuten parabenejä.

Tämän keksinnön mukaisia yhdisteitä valmistetaan tavallisesti kerta-annosmuotoon, joka kerta-annosta kohti sisältää 0,000 1 - 100 mg aktiivista ainesosaa farmaseuttisesti hyväksyttävään kantaja-aineeseen yhdistettynä.

Kun tämän keksinnön mukaisia yhdisteitä annetaan lääkkeeksi potilaille, esimerkiksi ihmisille, niin niiden annostuksessa on asiaankuuluvaa käyttää annostusta 1 - 500 mg päivässä, esimerkiksi noin 100 mg annosta kohti.

On osoitettu, että yleisen kaavan I mukaiset yhdisteet kykenevät vapauttamaan endogeenistä kasvuhormonia in vivo -olosuhteissa. Näitä yhdisteitä voidaan tästä syystä käyttää sellaisten tautien hoidossa, joissa vaaditaan plasman kasvuhormonipitoisuuksien nostamista, kuten ihmisillä, joilla on kasvuhormonien puutetta tai iäkkäillä potilailla tai karjalla.

Keksintö liittyy siten yhdessä tietyssä nimenomaisessa kohteessa farmaseuttiseen koostumukseen, jolla on tarkoitus stimuloida kasvuhormonin vapautumista aivolisäkkeestä, ja

koostumus sisältää aktiivisena ainesosana yleisen kaavan I mukaista yhdistettä tai tämän farmaseuttisesti hyväksyttävää suolaa farmaseuttisesti hyväksyttävään kantaja-aineeseen tai laimentimeen yhdistettynä.

Toisessa kohteessa keksintö liittyy menetelmään, jolla on tarkoitus stimuloida kasvuhormonin vapautumista aivolisäkkeestä, ja menetelmä käsittää sen, että tällaisen tarpeessa olevalle potilaalle annetaan tehokas määrä yleisen kaavan I mukaista yhdistettä tai tämän farmaseuttisesti hyväksyttävää suolaa.

Vielä yhdessä kohteessa tämä keksintö liittyy yleisen kaavan I mukaisen yhdisteen tai tämän farmaseuttisesti hyväksyttävän suolan käyttöön sellaisen lääkkeen valmistamiseen, jolla on tarkoitus stimuloida kasvuhormonin vapautumista aivolisäkkeestä.

Alan ammattikokemuksen perusteella on tunnettua, että kasvuhormonin nykyiset ja mahdolliset käyttömuodot ihmisellä ovat monenlaisia ja monentyyppisiä. On odotettavissa, että kaavan I mukaisia yhdisteitä voidaan antaa siihen tarkoitukseen, että ne stimuloivat kasvuhormonin vapautumista aivolisäkkeestä ja niiden vaikutukset ja käyttömuodot olisivat siten samanlaiset kuin itse kasvuhormonilla. Kasvuhormonin käyttömuodot voidaan esittää yhteenvetona seuraavasti: kasvuhormonin vapautumisen stimulointi iäkkäillä ihmisillä; glukokortikoidien katabolisten sivuvaikutusten ehkäiseminen, osteoporoosin hoito, immuunijärjestelmän stimulointi, haavan paranemisen jouduttaminen, luunmurtuman paranemisen jouduttaminen, hidaskasvuisuuden hoito, hidaskasvuisuudesta johtuvan munuaisten toimintakyvyn menetyksen tai vajaatoiminnan hoito, fysiologisen lyhytkasvuisuuden, mukaan lukien kasvuhormonivajavuutta sairastavien lasten, hoito ja krooniseen sairauteen liittyvän lyhytkasvuisuuden hoito, lihavuuden ja lihavuuteen liittyvän kasvun hidastumisen hoito, Prader'in ja Willin oireyhtymään ja Turner'in oireyhtymään liittyvän

hidaskasvuisuuden hoito; palovammapotilaiden toipumisen edistäminen ja sairaalahoidon tarpeen lyhentäminen; kohdunsisäisen hidaskasvuisuuden hoito, luuston kehityshäiriö, hyperkortisolismi ja Cushing'in oireyhtymä, kasvuhormonin vapautumisen aikaansaaminen sykäyksittäisesti; kasvuhormonin korvaushoito stressipotilailla, osteokondrodysplasioiden hoito, Noonanin oireyhtymän hoito, skitsofrenian, depressioiden, Alzheimerin taudin, haavojen parantumisen pitkittymisen ja psykososiaalisen eristäytyneisyyden hoito, keuhkojen vajaatoiminnan ja hengityslaiteesta riippuvuuden hoito, proteiinikatabolisten vasteiden heikentäminen suuren leikkausoperaation jälkeen, kroonisesta sairaudesta, kuten syövästä tai AIDS:sta, johtuvan kakeksian ja proteiinien hävikin pienentäminen, hyperinsulinemian, mukaanlukien nesidioblastoosi, hoito, adjuvanttihoito ovulaation aikaansaamiseksi; hormonin käyttö kateenkorvan kehittymisen stimulaatioon ja iän mukana tapahtuvan kateenkorvan toiminnan heikkenemisen ehkäisemiseen, potilaiden hoitoon, joiden immunologisen järjestelmän toiminta on vaillinaista, lihasvoiman, liikuntakyvyn, ihon paksuuden ylläpitokyvyn, metabolisen homeostaasin, munuaishomeostaasin parantamiseen heikkokuntoisilla vanhuksilla, osteoblastien, luiden uudelleenmuotoutumisen ja ruston kasvun stimulaatioon, immuunijärjestelmän stimulaatioon seuraeläimillä ja vanhentumissairauden hoitoon seuraeläimillä, kasvun edistäjänä karjalla ja villan kasvun stimulointiin lampailla.

Edellä olevien hoidon syiden kyseessä ollessa voi annostus vaihdella käytetyn kaavan I mukaisen yhdisteen, antotavan ja halutun hoidon mukaan. Endogeenisen kasvuhormonin tehokkaan vapautumisen aikaansaamiseksi voidaan annostuksena käyttää potilaille ja eläimille yleensä määriä, jotka ovat alueella 0,000 1 - 100 mg ruumiinpainokiloa kohti päivässä. Oraaliseen tai nasaaliseen annosteluun käytettävät lääkemuodot sisältävät tavallisesti noin 0,000 1 - noin 100 mg ja edullisesti noin 0,001 - noin 50 mg kaavan I mukaista yhdistettä

farmaseuttisesti hyväksyttävään kantaja-aineeseen tai laimentimeen yhdistettynä.

Kaavan I mukaisia yhdisteitä voidaan antaa farmaseuttisesti hyväksyttävässä happoadditiosuolamuodossa tai silloin kun tämä on asiaankuuluvaa, alkalimetalli- tai maa-alkalimetalli- tai alempialkyyliammoniumsuolana. Tällaisten suolamuotojen aktiivisuuden otaksutaan olevan suunnilleen samaa luokkaa kuin vapaiden emäsmuotojen aktiivisuuden.

Tämän keksinnön mukainen farmaseuttinen koostumus voi mahdollisesti sisältää kaavan I mukaista yhdistettä yhdistettynä yhteen tai useampaan sen aktiivisuudesta poikkeavaan yhdisteeseen, esimerkiksi antibioottiin tai muuhun farmakologisesti aktiiviseen materiaaliin. Tämä voisi olla jokin muu hormonin erittymistä edistävä aine, kuten GHRP (1 tai 6) tai GHRH tai tämän analogi, kasvuhormoni tai tämän analogi tai somatomediini, kuten IGF-1 tai IGF-2.

Annostelutie voi olla mikä tahansa sellainen annostelutie, jolla aktiivinen yhdiste kulkeutuu tehokkaasti asiaankuuluvaan tai haluttuun vaikutuskohtaan, kuten esimerkiksi oraalinen, nasaalinen tai parenteraalinen annostelutie, ja oraalinen annostelutie on edullinen vaihtoehto.

Sen lisäksi, että kaavan I mukaisia yhdisteitä käytetään farmaseuttisesti, ne voivat olla käyttökelpoisia apuvälineitä kasvuhormonin vapautumisen säätelyn tutkimiseen in vitro -olosuhteissa.

Kaavan I mukaiset yhdisteet voivat myös olla käyttökelpoisia apuvälineitä aivolisäkkeen kasvuhormoninvapauttamiskyvyn arvioimiseksi in vivo -olosuhteissa. Esimerkiksi kasvuhormoni voidaan määrittää seeruminäytteistä, jotka on otettu ennen näiden yhdisteiden antamista ihmiselle tai tämän jälkeen. Vertaamalla kussakin seeruminäytteessä olevaa

kasvuhormonipitoisuutta kyettäisiin määrittämään suoraan potilaiden aivolisäkkeen kyky vapauttaa kasvuhormonia.

Kaavan I mukaisia yhdisteitä voidaan antaa kaupallisesti tärkeille eläimille niiden kasvunopeuden ja kasvun määrän lisäämiseksi sekä maidontuotannon lisäämiseksi.

Farmakologiset menetelmät

Kaavan I mukaisista yhdisteistä voidaan määrittää in vitro -olosuhteissa niiden tehokkuus ja voimakkuus vapauttaa rotan primaaristen somatotropiinisolujen sisältämää kasvuhormonia.

Rotan primaarisiä somatotropiinisoluja voidaan valmistaa olennaisesti aikaisemmin kuvatulla tavalla [Chen, et al., Endocrinology 129 (1991) 3337 - 3342 ja Chen, et al., Endocrinology 124 (1989) 2791 - 2798]. Lyhyesti mainittuna rotat tapetaan dekapitoimalla. Aivolisäke poistetaan nopeasti. Aivolisäkkeet hajotetaan 0,2-%:isella kollagenaasilla ja 0,2-%:isella hyaluronidaasilla Hanks'in tasapainotetussa suolaliuoksessa. Solut suspendoidaan uudelleen Dulbeccon modifioimaan Eaglen mediumiin, jonka koostumus on 0,37 % $NaHCO_3$, 10 % hevosen seerumia, 2,5 % fetaalista vasikanseerumia, 1 % ei-välttämättömiä aminohappoja, 1 % glutamiinia ja 1 % penisilliinin ja streptomysiinin seosta ja sen solukonsentraatio säädetään 1,5 x 10^5 soluksi millilitrassa. 1 millilitra tätä suspensiota pipetoidaan kuhunkin 24-kuoppaisen levyn kuoppaan ja levyn annetaan jäädä paikoilleen 2 - 3 päiväksi, minkä jälkeen tehdään vapautumismääritykset.

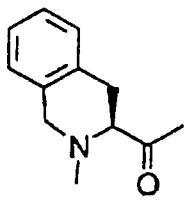
Kokeiden 1. päivänä solut pestään kaksi kertaa edellä olevalla mediumilla, joka sisältää 25 mM Hepes'iä, jonka pH on 7,4. Kasvuhormonin vapautuminen käynnistetään lisäämällä seokseen mediumia, joka sisältää 25 mM Hepes'iä ja tutkittavaa yhdistettä. Seoksia inkuboidaan 15 minuuttia 37 °C:ssa. Mediumiin vapautunut kasvuhormoni määritetään inkuboinnin jälkeen tavallisella RIA:lla.

Kaavan I mukaisista yhdisteistä voidaan arvioida niiden vaikutukset in vivo -olosuhteissa kasvuhormonin vapautumiseen fenobarbitaalilla nukutetuissa naaraspuolisissa rotissa aikaisemmin kuvatulla tavalla [Bercu, et al., Endocrinology 129 (1991) 2592 - 2598]. Lyhyesti mainittuna nukutetaan Sprague-Dawley-rotat pentobarbitaalilla käyttäen annoksena 50 mg/kg ip. Kun rotat ovat täydellisesti anestetisoituneet, niin niihin implantoidaan keuhkoputkikanyyli ja kaulavaltimoon ja kaulalaskimoon tulevat katetrit. 15 minuutin toipumisajan jälkeen otetaan verinäyte ajankohdalla 0. Aivolisäkkeen hormoneja vapauttavia yhdisteitä annostellaan iv ja valtimoverinäytteet pannaan jäihin 15 minuutin ajaksi, minkä jälkeen niitä sentrifugoidaan 2 minuutin ajan 12 000 x g:n voimalla. Seerumi dekantoidaan ja kasvuhormonin määrä määritetään normaalia RIA:ta käyttäen.

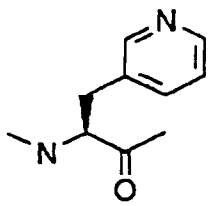
Keksintöä kuvataan tarkemmin seuraavissa esimerkeissä, joiden tarkoituksena ei ole millään tavalla rajoittaa tätä keksintöä siinä muodossa missä se on esitetty patenttivaatimuksissa. Tässä patenttiselityksessä ja esimerkeissä käytetyt lyhenteet tarkoittavat seuraavia rakenteita:

Lyhenteet, jotka tarkoittavat aminohapporyhmiä, joita ei esiinny luonnossa:

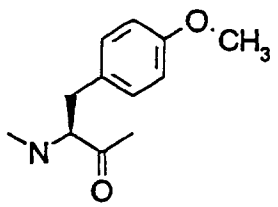
Tic



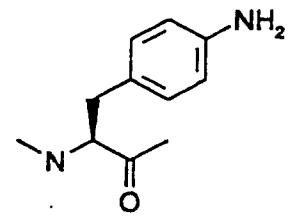
3Pyal



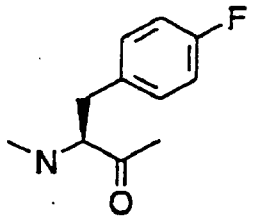
Phe(4OMe)



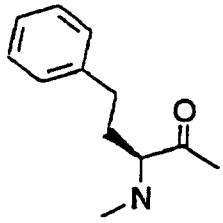
Phe(4-NH_2)



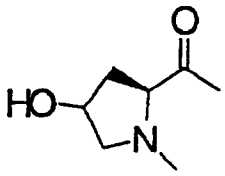
Phe(4-F)



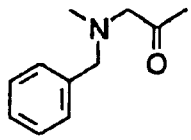
hPhe



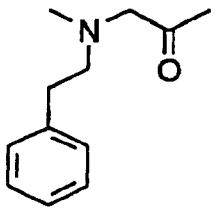
Hyp



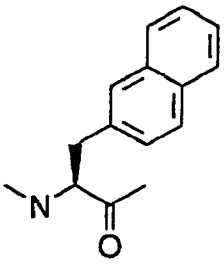
N-Bzl-Gly



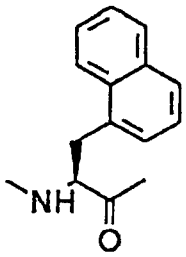
N-(fenetyyli)-Gly



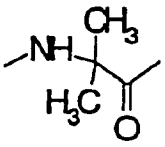
2Nal



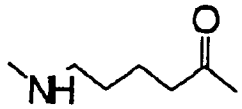
1Nal



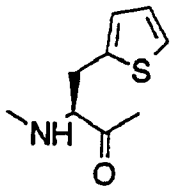
Aib



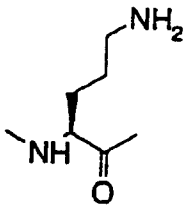
5Apent



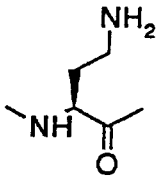
Thial



Orn

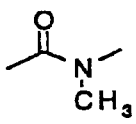
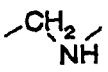
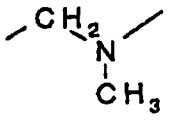


Dab



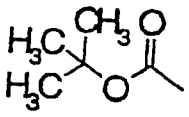
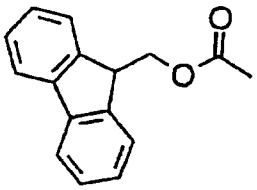
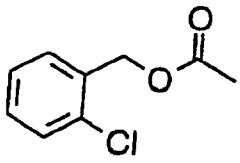
Lyhenteet, joita on käytetty peptidisidosten substituutioista:

-N-Me- $\psi(CH_2NH)$ $\psi(CH_2N(Me))$

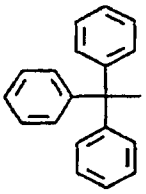
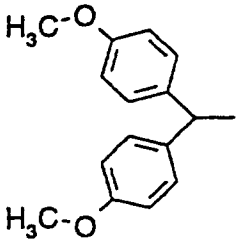
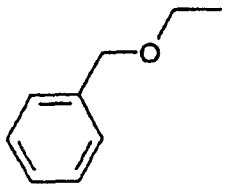




Lyhenteet, joita on käytetty suojaavista ryhmistä:

Boc- Fmoc- Cl-Z-

Trt- Dod- Bom

Seuraavissa esimerkeissä valmistetut yhdisteet eristettiin kaikki trifluorietikkahappo (TFA) -suoloina.

Esimerkki 1

H-Ala-His-D-2Nal-D-Trp-Lys-NH_2

Otsikon mukaista peptidiä syntetoitiin Fmoc-strategian mukaisesti Applied Biosystems 431A-peptidisyntetointilaitteella 0,22 mmol mittakaavassa käyttäen valmistajan toimittamia FastMoc UV-suoritusvaiheita, joissa käytetään HBTU:n (2-(1H-bentsotriatsol-1-yyli)-1,1,3,3-tetrametyyliuroniumheksafluorifosfaatti) välityksellä tehtyjä kytkentöjä NMP:ssa (N-metyylipyrrolidonissa) ja seuraamalla suojaavien

Fmoc-ryhmien poistumista UV:n avulla. Synteesiin käytetty hartsilähtömateriaali oli 559 mg 4-((2',4'-dimetoksifenyyli)-(Fmoc-amino)metyyli)-fenoksihartsia (Novabiochem, Bad Soden, Saksa, tuoteluettelon nro: 01-64-0013), jonka substituutiokapasiteetti oli 0,39 mmol/g. Käytetyt suojatut aminohappojohdannaiset olivat Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-D-Trp-OH, Fmoc-2Nal-OH, Fmoc-His(Trt) ja Fmoc-Ala-OH.

Peptidi irrotettiin 434 mg:sta peptidihartsia sekoittamalla sitä 180 minuuttia huoneenlämmössä seoksen kanssa, jonka koostumus oli 4 ml TFA:ta (trifluorietikkahappoa), 300 mg fenolia, 100 µl etaaniditiolia, 200 µl tioanisolia ja 200 µl H_2O:ta. Pilkkomisseos suodatettiin ja suodos konsentroitiin 1 ml:ksi typpivirran avulla. Puhdistamaton peptidi saostettiin tästä öljystä 45 ml:lla dietyylieetteriä ja pestiin 3 kertaa 50 ml:lla dietyylieetteriä.

Puhdistamaton peptidi kuivattiin ja puhdistettiin puolipreparatiivisella HPLC:lla 20 mm x 250 mm:n suuruisessa kolonnissa, joka oli pakattu 7 µm:n C-18-silikalla ja tasapainotettu etukäteen 15-%:isella CH_3CN:lla 0,05 M $(NH_4)_2SO_4$:ssa, jonka pH oli säädetty arvoon 2,5 4 M H_2SO_4:lla. Puhdistamaton peptidi liuotettiin 2 ml:aan H_2O:hon valmistettua seosta, joka sisälsi 70 % CH_3CN:a ja 0,1 % TFA:ta. Tämä liuos jaettiin kahteen yhtä suureen osaan ja kukin niistä injektoitiin kolonniin kahdessa eri ajossa. Kolonni eluoitiin virtausnopeudella 10 ml/min 47 minuutin aikana 40 °C:ssa 15 - 25-%:isella CH_3CN-gradientilla 0,05 M $(NH_4)_2SO_4$:ssa, jonka pH oli 2,5. Peptidiä sisältävät fraktiot koottiin talteen, laimennettiin kolminkertaisella tilavuudella H_2O:ta ja ne käsiteltiin Sep-Pak® C18-patruunalla (Waters'in osaluettelo nro 51 910), joka oli tasapainotettu 0,1-%:isella TFA:lla. Peptidi eluoitiin Sep-Pak®-patruunasta 70-%:isella CH_3CN:lla, joka sisälsi 0,1 % TFA:ta, ja eristettiin eluaatista lyofilisoimalla veteen tehdyn laimentamisen jälkeen. Saatiin 19,0 mg:n suuruinen saanto.

Aikaansaatu lopputuote luonnehdittiin analyyttisella RP-HPLC:lla (retentioaika) ja plasmadesorptiomassaspektrometrialla (suhteellinen moolimassa). Massaspektrometria antoi yhtäpitävät tulokset odotetun rakenteen suhteen tämän menetelmän koevirheiden puitteissa (massaspektrometri ± 0,9 amu).

RP-HPLC-analyysi suoritettiin käyttäen havaitsemista UV:lla 214 nm:n kohdalta ja Vydac'in 218TP54 4,6 mm x 250 mm 5 μm C-18-silikakolonnissa (The Separations Group, Hesperia), jota eluoitiin virtausnopeudella 1 ml/min 42 °C:ssa. Käytettiin kahta erilaista eluointiolosuhdetta, jotka olivat:

A1: Kolonni tasapainotettiin 5-%:isella CH_3CN:lla puskurissa, joka koostui 0,1 M $(NH_4)_2SO_4$:sta, jonka pH oli säädetty arvoon 2,5 4 M H_2SO_4:lla, ja kolonnia eluoitiin 5 - 60-%:isella CH_3CN-gradientilla samassa puskurissa 50 minuutin ajan.

B1: Kolonni tasapainotettiin seoksella, jonka koostumus oli 5 % CH_3CN/0,1 % TFA/H_2O, ja eluoitiin 50 minuutin ajan gradienttijärjestelmällä, jonka koostumus aloitettaessa oli 5 % CH_3CN/0,1 % TFA/H_2O ja koostumus lopetettaessa 60 % CH_3CN/0,1 % TFA/H_2O.

Käyttäen eluointiolosuhteita A1 ja B1 havaittiin näitä vastaavien retentioaikojen olevan 17,88 min ja 20,15 min.

Esimerkki 2

H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-OH

Otsikon mukaista peptidiä syntetoitiin käyttäen suoritusvaiheita, jotka olivat samanlaiset kuin mitä oli kuvattu esimerkin 1 kyseessä ollessa lukuunottamatta sitä, että lähtömateriaalina käytettävänä hartsina käytettiin 450 mg Fmoc-Lys(Boc)-Wang-hartsia (Novabiochem, Bad Soden, Saksa, tuoteluettelon nro 04-12-2014), jonka substituutiokapa-

siteetti oli 0,49 mmol/g. Kun peptidi oli pilkottu irti 560 mg:sta peptidihartsia ja 1/2 tulokseksi saadusta puhdistamattomasta peptidistä oli puhdistettu esimerkissä 1 kuvatulla tavalla, saatiin saannoksi 25,9 mg.

Lopputuote luonnehdittiin esimerkissä 1 kuvatulla tavalla. Käyttäen eluointiolosuhteita A1 ja B1 havaittiin näitä vastaavien retentioaikojen olevan 18,30 min ja 20,15 min.

Esimerkki 3

5-(H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-NH)aminopentaani

Peptidihartsia, H-Ala-His(Trt)-D-2Nal-D-Phe-Sasrin-hartsia, syntetoitiin käyttäen samanlaisia suoritusvaiheita kuin esimerkissä 1 kuvatut suoritusvaiheet lukuunottamatta sitä, että tässä käytettiin 262 mg Sasrin-hartsia (2-metoksi-4-alkoksibentsyylialkoholihartsi) (Bachem, Bubendorf, Sveitsi, tuoteluettelon numero D-1295), jonka substituutiokapasiteetti oli 0,96 mmol/g, ja menetelmä ensimmäisen aminohappo-ryhmän kytkemiseksi hartsiin oli etukäteen valmistetun symmetrisen anhydridin kytkeminen 4-dimetyyliaminopyridiinin katalysoimana, minkä jälkeen hartsin jäljellä olevat OH-ryhmät peitettiin bentsoehappoanhydridillä.

Osittain suojattu peptidi 5-(H-Ala-His(Trt)-D-2Nal-D-Phe-NH)aminopentaani pilkottiin 56 mg:sta H-Ala-His(Trt)-D-2Nal-D-Phe-Sasrin-hartsia sekoittamalla seosta 20 h huoneenlämmössä 0,5 ml:ssa 1,5-diaminopentaania. Käytetty hartsi erotettiin suodattamalla ja uutettiin 1 ml:lla DMF:ää. Yhdistetyt suodos ja uute lisättiin hitaasti seosta samalla sekoittaen seokseen, joka sisälsi 2,5 ml CH_3CN:ää ja 10 ml 1 M kloorivetyhappoa, ja kun seos oli ensin laimennettu 50 ml:ksi 25-%:isella CH_3CN:lla, niin se jätettiin sitten 4 °C:een 100 h ajaksi (histidiinin trityylisuojauksen pilkkomiseksi). Tämän jälkeen seos laimennettiin 200 ml:ksi H_2O:lla ja se suodatettiin.

Puhdistamaton peptidi puhdistettiin puolipreparatiivisella HPLC:lla ruiskuttamalla 1/2 tätä suodosta suoraan kolonniin käyttäen samanlaisia suoritusvaiheita kuin mitä on kuvattu esimerkissä 1. Saanto oli 4,5 mg.

Lopputuote luonnehdittiin menetellen samoin kuin esimerkissä 1. Käyttäen eluointiolosuhteita A1 ja B1 havaittiin näitä vastaavien retentioaikojen olevan 18,43 min ja 20,75 min.

Esimerkki 4
(2S)-(H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-NH)-6-aminoheksanoli

Peptidihartsia, H-Ala-His(Trt)-D-2Nal-D-Phe-Lys(Boc)-Sasrin-hartsia, syntetoitiin Sasrin-hartsista, jonka substituutiokapasiteetti oli 0,96 mmol/g, käyttäen samanlaisia suoritusvaiheita kuin mitä on kuvattu esimerkissä 3.

Osittain suojattu peptidi (2S)-(H-Ala-His(Trt)-D-2Nal-D-Phe-NH)-6-aminoheksanoli pilkottiin irti 200 mg:sta H-Ala-His(Trt)-D-2Nal-D-Phe-Lys(Boc)-Sasrin-hartsia sekoittamalla peptidihartsia 20 h huoneenlämmössä seoksessa, jonka koostumus oli 1,2 ml THF (tetrahydrofuraani), 0,2 ml etanoli, 23 mg LiBr ja 10 mg $NaBH_4$. Seokseen lisättiin sitten 200 µl H_2O:ta, 200 µl etikkahappoa ja 4 ml etanolia. Hartsihelmet poistettiin suodattamalla ja suodos laimennettiin 50 ml:lla H_2O:ta ja se lyofilisoitiin. Tulokseksi saatu jauhe pilkottiin TFA:lla ja materiaali puhdistettiin esimerkissä 1 kuvatulla tavalla. Puhdistus oli toistettava riittävän puhtaan tuotteen aikaansaamiseksi. Saatiin 5,8 mg:n suuruinen saanto.

Lopputuote luonnehdittiin menetellen samoin kuin esimerkissä 1. Käyttäen eluointiolosuhteita A1 ja B1 havaittiin näitä vastaavien retentioaikojen olevan 17,82 min ja 20,02 min.

Esimerkki 5

H-Ala-Hisψ(CH_2NH)D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

Peptidihartsia, H-D-2Nal-D-Phe-Lys-(Boc)-hartsia, syntetoitiin käyttäen menetelmää, jollainen on kuvattu esimerkissä 1, ja käyttäen lähtömateriaalina 556 mg 4-((2',4'-dimetoksifenyyli)-(Fmoc-amino)metyyli)-fenoksihartsi-hartsia (Novabiochem AG Sveitsi, tuoteluettelon nro: 01-64-0013), jonka substituutiokapasiteetti oli 0,34 mmol/g. Käytettiin seuraavia suojattuja aminohappojohdannaisia: Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-D-Phe-OH ja Fmoc-2Nal-OH.

Peptidisidoksen -CH_2NH-isosteeri valmistettiin molekyyliin julkaisun Sasaki, Y. ja Coy, D.H., Peptides 8(1) (1987) 119 - 121, mukaisesti.

Fmoc-His(TRT)-aldehydiä valmistettiin 820 mg:sta vastaavaa N,O-dimetyylihydroksamaattia julkaisun Fehrentz, J.-A. ja Castro, B., Synthesis (1983) 676 - 678 mukaisesti. Puhdistamaton aldehydi liuotettiin 8 ml:aan DMF:ää ja jaettiin kahteen osaan. Ensimmäinen osa lisättiin huoneenlämmössä seosta samalla sekoittaen lietteeseen, joka sisälsi 610 mg H-D-2Nal-D-Phe-Lys-hartsia 10 ml:ssa DMF:ään valmistettua 1-%:ista etikkahappoa. Seokseen lisättiin sitten 57 mg $NaCNBH_3$:a (puhtausaste 85 %), joka oli liuotettu 1 ml:aan DMF:ää, ja sekoitusta jatkettiin 60 min. Peptidihartsi eristettiin sitten suodattamalla ja se pestiin 1-%:isella etikkahapolla DMF:ssa. Peptidihartsi suspendoitiin uudelleen 10 ml:aan DMF:ään valmistettua 1-%:ista etikkahappoa ja seokseen lisättiin toinen osa Fmoc-His(TRT)-aldehydiä. Seokseen lisättiin huoneenlämmössä uudelleen 57 mg $NaCNBH_3$:a (puhtausaste 85 %), joka oli liuotettu 1 ml:aan DMF:ää, ja seosta sekoitettiin 18 h.

Tämän pelkistävän alkylointivaiheen jälkeen peptidihartsi eristettiin suodattamalla ja pestiin DMF:ään valmistetulla 1-%:isella etikkahapolla ja ketjun pidentäminen suoritettiin

loppuun käyttäen peptidisynteesilaitetta edellä kuvattujen suoritusvaiheiden mukaisesti käyttäen suojattua aminohappojohdannaista Fmoc-Ala-OH.

Peptidi pilkottiin 550 mg:sta peptidihartsia ja puhdistamaton peptidi puhdistettiin puolipreparatiivisella HPLC:llä käyttäen suoritusvaiheita, jotka olivat samanlaiset kuin esimerkissä 1 kuvatut suoritusvaiheet. Saannoksi saatiin 11,3 mg.

Lopputuote luonnehdittiin menetellen samoin kuin esimerkissä 1. Käyttäen eluointiolosuhteita A1 ja B1 havaittiin näitä vastaavien retentioaikojen olevan 13,35 min ja 17,38 min.

Esimerkki 6

(n-propyyli)-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2 ja (n-propyyli)$_2$-His-D-2-Nal-D-Phe-Lys-NH_2

Peptidihartsia, H-His(Trt)-D-2Nal-D-Phe-Lys(Boc)-hartsia, syntetoitiin käyttäen suoritusvaiheita, jotka olivat samanlaiset kuin esimerkissä 1 kuvatut suoritusvaiheet, käyttäen lähtömateriaalina 4-((2',4'-dimetoksifenyyli)-(Fmoc-amino)-metyyli)-fenoksihartsi-hartsia (Novabiochem AG Sveitsi, tuoteluettelon nro: 01-64-0013), jonka substituutiokapasiteetti oli 0,34 mmol/g. Käytetyt suojatut aminohappojohdannaiset olivat Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-D-Phe-OH, Fmoc-2Nal-OH ja Fmoc-His(Trt)-OH.

13 µl n-propanaalia lisättiin huoneenlämmössä seosta samalla sekoittaen lietteeseen, joka sisälsi 150 mg H-His(Trt)-D-2Nal-D-Phe-Lys-hartsia 3,3 ml:ssa DMF:ään valmistettua 1-%:ista etikkahappoa. Seokseen lisättiin sitten 16,8 mg $NaCNBH_3$:a (puhtausaste 85 %), joka oli liuotettu 0,5 ml:aan DMF:ää, ja sekoitusta jatkettiin 6 h. Tämän pelkistävän alkylointivaiheen jälkeen peptidihartsi eristettiin ja pestiin suodatinsuppilolla DMF:llä ja CH_2Cl_2:lla ja kuivattiin vakuumissa.

Kaksi tulokseksi saatua peptidihartsia yhdistettiin toisiinsa ja seos, joka sisälsi alkyloimatonta mono-n-propyyli- ja di-n-propyylipeptidiä, pilkottiin tulokseksi saadusta 300 mg:n suuruisesta peptidihartsierästä. Peptidit erotettiin ja puhdistettiin puolipreparatiivisella HPLC:llä esimerkissä 1 kuvattua menetelmää muistuttavalla menetelmällä. Saannoiksi saatiin 6,54 mg n-propyyli-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2:ta ja 5,59 mg (n-propyyli)$_2$-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2:ta.

Lopputuotteet luonnehdittiin esimerkissä 1 kuvatulla tavalla. (n-propyyli)-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2:n kyseessä ollessa havaittiin eluointiolosuhteita A1 ja B1 käyttäen näitä vastaavien retentioaikojen olevan 16,45 min ja 19,92 min.

Esimerkki 7

H-Ala-Tic-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

Peptidi syntetoitiin Boc-strategiaa noudattaen käyttäen lähtömateriaalina 620 mg 4-metyyli-BHA-hartsia (Bissendorf Biochemicals, Hannover, Saksa, tuoteluettelon nro: RMIS50), jonka substituutiokapasiteetti oli 0,72 mmol/g, Applied Biosystems 430A-peptidisyntetointilaitteella noudattamalla valmistajalta saatuja 0,5 mmol mittakaavan yksittäisiin kytkentöihin tarkoitettuja suoritusohjeita, joissa suoritus tapahtuu yksittäisin kytkennöin etukäteen valmistettuja DMF:ään liuotettuja symmetrisiä aldehydejä käyttäen. Suoritusohjeet sovitettiin 60 minuutin kytkentäaikaan. N-terminaalisen Ala:n kyseessä ollessa käytettiin kaksinkertaista kytkentää käyttämällä kytkentäaikana 2 x 60 minuuttia. Synteesiin käytetyt suojatut aminohappojohdannaiset olivat Boc-Lys(2-kloori-Z)-OH, Boc-D-Phe-OH, Boc-D-2Nal-OH, Boc-Tic-OH ja Boc-Ala-OH.

Peptidi pilkottiin 486 mg:sta peptidihartsia sekoittamalla tätä 75 minuuttia 0 °C:ssa seoksella, joka sisälsi 4,5 ml HF:ää ja 500 µl m-kresolia. HF haihdutettiin 0 °C:ssa typpivirralla. Peptidi saostettiin 50 ml:lla dietyylieetteriä

jäljellä olevasta öljystä yhdessä käytetyn hartsin kanssa ja pestiin kaksi kertaa 50 ml:lla dietyylieetteriä. Kuivauksen jälkeen peptidi eristettiin saostumasta 10 ml:lla H_2O:ta, joka sisälsi 4 pisaraa etikkahappoa. Uute laimennettiin 100 ml:ksi H_2O:ta

Puhdistamaton peptidi puhdistettiin 2 x 18 ml:sta laimennettua uutetta käyttäen kahta puolipreparatiivistä HPLC-ajoa käyttäen samanlaisia suoritusvaiheita kuin mitä on kuvattu esimerkissä 1. Saanto oli 17,3 mg.

Lopputuote luonnehdittiin esimerkissä 1 kuvatulla tavalla. RP-HPLC-analyysista käyttäen olosuhteita A1 ja B1 saatiin näitä vastaaviksi retentioajoiksi 27,37 min ja 29,50 min.

Esimerkki 8
(2R)-(H-Ala-His-D-2Nal-NH)-3-fenyylipropyyliamiini

Fmoc-ryhmä poistettiin 580 mg:sta 4-((2',4'-dimetoksifenyyli)-(Fmoc-amino)metyyli)-fenoksihartsi-hartsia (Novabiochem AG Sveitsi, tuoteluettelon nro: 01-64-0013), jonka substituutiokapasiteetti oli 0,43 mmol/g, käsittelemällä tätä 20-%:isella piperidiinillä NMP:ssa 20 minuutin ajan. Hartsi pestiin DMF:lla ja CH_2Cl_2:lla ja alkyloitiin Fmoc-D-Phe-aldehydillä käyttäen esimerkissä 5 kuvattua pelkistävää alkylointimenetelmää.

Tämän jälkeen peptidihartsi eristettiin suodattamalla ja se pestiin suodatinsuppilossa DMF:ään valmistetulla 1-%:isella etikkahapolla ja ketjun pidentäminen vietiin loppuun käyttäen peptidisynteesilaitetta esimerkissä 1 kuvatulla tavalla käyttäen suojattuja Fmoc-D-2Nal-OH-, Fmoc-His(Trt)-OH- ja Fmoc-Ala-OH-aminohappojohdannaisia.

Peptidi irrotettiin 301 mg:sta peptidihartsia ja puhdistamaton peptidi puhdistettiin puolipreparatiivisella HPLC:lla käyttäen suoritusvaiheita, jotka olivat samanlaiset kuin

esimerkissä 1 kuvatut suoritusvaiheet. Saannoksi saatiin 23,92 mg.

Lopputuote luonnehdittiin esimerkissä 1 kuvatulla tavalla. Käyttäen olosuhteita A1 ja B1 havaittiin näitä vastaavien retentioaikojen olevan 19,33 min ja 21,77 min.

Esimerkit 9 - 54

Esimerkki	Peptidi	Valmistettu suoritusvaiheilla, jotka vastaavat esimerkkiä	A1-olosuhteita koskeva RP-HPLC-retentioaika (esim. 1)	B1-olosuhteita koskeva RP-HPLC-retentioaika (esim. 1)
9	H-Ala-His-D-Phe-D-Phe-Lys-NH_2	1	12,53	15,43
10	H-Ala-Phe-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2	1	28,13	29,62
11	H-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2	1	18,02	20,15
12	H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-Phe-NH_2	1	28,48	29,48
13	H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-D-Phe-NH_2	1	26,65	27,75
14	H-Ala-His-D-2Nal-Phe-Lys-NH_2	1	21,85	23,12
15	(3-(4-imidatsolyyli)propionyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2	1	20,7	
16	(Propionyyli)-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2	1	22,2	23,77
17	H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-NH_2	1	21,7	23,08
18	(H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-NH)-heksaani	3	34,11	35,78

	19	H-Ala-His-D-Trp-D-Phe-Lys-NH_2	1	14,52	16,7
	20	H-Ala-Ala-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2	1	21,97	23,23
	21	((Propionyyli)-His-D-2Nal-D-Phe-NH)heksaani	3	37,17	39,47
	22	6-(H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-NH)heksyyliamiini	3	19,3	21,57
5	23	H-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2	1	15,88	18,25
	24	(5-aminopentanoyyli)-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2	1	17,8	19,98
	25	H-D-Lys-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2	1	17,07	19,62
	26	H-Ala-His-D-2Nal-D-Tic-Lys-NH_2	1	19,12	20,78
	27	H-D-Lys-Phe-2Nal-D-His-D-Ala-NH_2	1	18,15	20,48
10	28	(5-aminopentanoyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2	1	20,67	22,45
	29	H-D-Ala-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2	1	19,57	21,53
	30	(Propionyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2	1	26,7	27,92
	31	H-D-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2	1	17,83	20,3
	32	H-Ala-3-Pyal-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2	1	18,15	20,18
15	33	(n-butyyli)-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2	6	19,55	-
	34	(n-oktyyli)-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2	6	27,88	24,52
	35	H-Ala-His-D-2Nal-D-PheΨ(CH_2-NH)Lys-NH_2	5	17,97	20,83
	36	(3-aminometyylibentsoyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2	1	22,42	24,13

37	(3-aminofenyyliasetyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2	1	23,62	23,97
38	((4-imidatsolyyli)asetyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2	1	20,42	22,22
39	(3-(4-imidatsolyyli)akryloyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2	1	21,25	23,32
40	(4-aminofenyyliasetyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2	1	22,45	-
41	(Trans-4-aminometyylisyklo-heksanoyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2	1	22,07	23,67
42	2-(H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-NH)-etyyliamiini	3	18,6	20,25
43	(2-(H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-NH)etyyli)bentseeni	3	30,18	32,18
44	4-((H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-NH)metyyli)bentsyyliamiini	3	19,63	21,55
45	(2R)-(H-Ala-His-D-2Nal-NH)-3-fenyylipropyyliamiini	4	21,55	23,57
46	2-(H-Ala-His-D-2Nal-NH)etyyliamiini	3	25,52	-
47	H-D-Phe-Ala-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2	1	27,82	29,43
48	H-Ala-D-Phe-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2	1	25,62	27,22
49	H-Ala-(2-aminobentsoyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2	7	26,42	24,93
50	H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2	1	17,42	20,13
51	H-Ala-His-D-1Nal-D-Phe-Lys-NH_2	1	17,55	19,8
52	H-Tyr-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2	1	19,9	21,22

53	(Piperidiini-4-karbonyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2	1	20,4	22,32
54	H-Ala-Phe(4-NH_2)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2	1	19,20	-

Esimerkki 55

((Propionyyli)-D-2Nal-D-Phe-NH)heksaani

Peptidihartsia, (propionyyli)-D-2Nal-D-Phe-Sasrin-hartsia, syntetoitiin Sasrin-hartsista, jonka substituutiokapasiteetti oli 0,96 mmol/g, käyttäen samanlaisia suoritusvaiheita kuin mitä on kuvattu esimerkissä 3.

105 mg tulokseksi saatua peptidihartsia käsiteltiin ammoniolyyttisesti.

Peptidi, ((propionyyli)-D-2Nal-D-Phe-NH)heksaani, irrotettiin 105 mg:sta propionyyli-D-2Nal-D-Phe-Sasrin-hartsia sekoittamalla tätä 20 h huoneenlämmössä 1 ml:n suuruisen N-heksyyliamiinierän kanssa. Käytetty hartsi erotettiin suodattamalla ja uutettiin 1 ml:lla DMF:ää. Yhdistetyt suodokset ja uute lisättiin hitaasti 8 ml:aan 1 M suolahappoa seosta samalla sekoittaen. Tulokseksi saatu saostuma liuotettiin uudelleen lisäämällä seokseen noin 70 ml CH_3CN:ää ja se saostettiin sitten uudelleen lisäämällä seokseen 20 ml H_2O:ta. Saostuma erotettiin suodattamalla pestiin H_2O:lla ja kuivattiin. Saanto oli 12 mg.

Tuote luonnehdittiin esimerkissä 1 kuvatulla tavalla paitsi että tässä käytettiin ainoastaan yhtä HPLC-analyysiä käyttäen olosuhteita, jotka olivat samanlaiset kuin B1 lukuunottamatta sitä, että suoritukseen käytettiin 50 minuutin ajoa gradientilla, jonka lähtömuoto oli 0,1 % TFA/H_2O ja loppumuoto 90 % CH_3CN/0,1 % TFA/H_2O. Retentioajan havaittiin olevan 35,73 min.

Esimerkki 56

(3-metyyliaminometyylibentsoyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

Peptidihartsia, (3-aminometyylibentsoyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys(Cl-Z)-MBHA-hartsia, syntetoitiin MBHA-hartsista, jonka substituutiokapasiteetti oli 0,72 mmol/g, käyttäen samanlaisia suoritusvaiheita kuin mitä on kuvattu esimerkissä 7.

Tulokseksi saatu peptidihartsi metyloitiin julkaisun Kaljuste, K. ja Undon, A., Int. J. Peptide Protein Res. 42 (1993) 118 - 124, mukaisesti. 300 mg hartsia sekoitettiin 2 h ajan seoksen kanssa, joka sisälsi 8 ml DCM:ää, 150 µl DIEA:ta (dietyyli-isopropyyliamiinia) ja 39 mg 4,4'-dimetoksidityylikloridia (DOD-Cl), ja materiaali eristettiin sitten suodattamalla ja pestiin DCM:lla ja DMF:lla. DOD:lla suojattua peptidihartsia sekoitettiin tämän jälkeen seoksen kanssa, jonka tilavuus oli 18 ml ja joka sisälsi DMF:aan valmistettua 3,7-%:ista formaldehydiliuosta ja 0,18 ml etikkahappoa, ja seokseen lisättiin sitten 180 mg $NaCNBH_3$:a ja sekoitusta jatkettiin 18 h ajan. Hartsi eristettiin suodattamalla ja pestiin DMF:lla ja DCM:lla. Suojaava DOD-ryhmä poistettiin tämän jälkeen käsittelemällä materiaalia 2 x 3 ml:lla DCM:n ja TFA:n seosta, jonka seossuhde oli 1 : 1, 5 min + 30 min ajan, mainitussa järjestyksessä ilmoitettuna, ja peptidihartsi pestiin DCM:lla ja kuivattiin sitten vakuumissa.

Tulokseksi saatu N-metyloitu peptidi irrotettiin 370 mg:sta tulokseksi saatua hartsia käyttäen suoritusvaiheita, jotka olivat samanlaiset kuin esimerkissä 7 kuvatut suoritusvaiheet, ja se puhdistettiin ja luonnehdittiin esimerkissä 1 kuvatulla tavalla. Saanto oli 17,3 mg.

RP-HPLC-analyysista A1- ja B1-olosuhteita käyttäen saatiin näitä vastaaviksi retentioajoiksi 22,83 min ja 24,60 min.

Esimerkki 57
(3-dimetyyliaminometyylibentsoyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

Peptidihartsia, (3-aminometyylibentsoyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-(Cl-Z)-MBHA-hartsia, syntetoitiin MBHA-hartsista, jonka substituutiokapasiteetti oli 0,72 mmol/g, käyttäen suoritusvaiheita, jotka olivat samanlaiset kuin esimerkissä 7 kuvatut suoritusvaiheet.

Tämän jälkeen 650 mg:n suuruista erää tulokseksi saatua peptidihartsia sekoitettiin seoksen kanssa, jonka tilavuus oli 20 ml ja joka sisälsi DMF:ään valmistettua 1-%:ista etikkahappoa ja 45 µl DMF:ään valmistettua 3,7-%:ista formaldehydiliuosta, minkä jälkeen seokseen lisättiin 55 mg $NaCNBH_3$:a (85 %) ja sekoitusta jatkettiin 18 h. Hartsi eristettiin suodattamalla ja pestiin DMF:llä, DCM:n ja MeOH:n seoksella, jonka seossuhde oli 6 : 4, ja DCM:llä.

Tulokseksi saatu N,N-dimetyloitujen peptidien seos irrotettiin 631 mg:sta tulokseksi saatua hartsia käyttäen suoritusvaiheita, jotka olivat samanlaiset kuin esimerkissä 7 kuvatut suoritusvaiheet, ja se puhdistettiin ja luonnehdittiin esimerkissä 1 kuvatulla tavalla. Saanto oli 8,58 mg.

RP-HPLC-analyysista A1- ja B1-olosuhteita käyttäen saatiin näitä vastaaviksi retentioajoiksi 31,58 min ja 33,00 min.

Esimerkki 58
(3-amino-3-metyylibutanoyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

Peptidihartsia, H-D-2Nal-D-Phe-Lys(Boc)-Rink-hartsia, syntetoitiin 2 g:sta 4-((2',4'-dimetoksifenyyli)-(Fmoc-amino)-metyyli)-fenoksihartsia (Rink hartsia) (Novabiochem, Bad Soden, Saksa, tuoteluettelon nro: 01-64-0013), jonka substituutiokapasiteetti oli 0,39 mmol/g käyttäen suoritusvaiheita, jotka olivat samanlaiset kuin esimerkissä 1 kuvatut suoritusvaiheet.

500 mg tulokseksi saatua peptidihartsia (0,15 mmol) suspendoitiin 4 ml:aan DCM:n ja MeOH:n seosta, jonka seossuhde oli 1 : 1. Seokseen lisättiin 4,2 µl trietyyliamiinia (0,3 mmol) ja kun seos oli ensin jäähdytetty 0 °C:een, niin siihen lisättiin sitten 31 mg (0,158 mmol) 2,2-dimetyyli-4-oksoatsetidiini-1-sulfonyylikloridia seosta samalla sekoittaen. Sekoitusta jatkettiin 0 °C:ssa 20 min ajan ja huoneenlämmössä 90 min ajan. Kun hartsi oli pesty DCM:n ja MeOH:n seoksella, jonka seossuhde oli 6 : 4, ja se oli kuivattu vakuumissa, niin puhdistamaton peptidi irrotettiin hartsista ja puhdistettiin käyttäen suoritusvaiheita, jotka olivat samanlaiset kuin esimerkissä 1 kuvatut suoritusvaiheet. Saanto oli 41,81 mg.

RP-HPLC-analyysista A1- ja B1-olosuhteita käyttäen saatiin näitä vastaaviksi retentioajoiksi 21,35 min ja 22,95 min.

Esimerkki 59

(2S)-((3-aminometyylibentsoyyli)ψ(CH_2NH)D-2Nal-D-Phe-NH)-6-aminoheksanoli

Peptidihartsia, H-D-2Nal-D-Phe-Lys(Boc)-Sasrin-hartsia, syntetoitiin 980 mg:sta Sasrin-hartsia, jonka substituutiokapasiteetti oli 0,87 mmol/g, käyttäen suoritusvaiheita, jotka olivat samanlaiset kuin esimerkissä 3 kuvatut suoritusvaiheet.

1,4 g tätä hartsia alkyloitiin pelkistävissä olosuhteissa Boc-3-aminometyylibentsaldehydillä ja peptidi irrotettiin 1,0 g:sta tulokseksi saatua hartsia ja puolet raakatuotteesta puhdistettiin käyttäen suoritusvaiheita, jotka olivat samanlaiset kuin esimerkissä 5 kuvatut suoritusvaiheet. Saanto oli 18,46 mg.

RP-HPLC-analyysista A1- ja B1-olosuhteita käyttäen saatiin näitä vastaaviksi retentioajoiksi 14,78 min ja 17,40 min.

Esimerkki 60

(2-aminometyylibentsoyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

Peptidihartsia, H-D-2Nal-D-Phe-Lys(Boc)-Rink-hartsia, syntetoitiin 2 g:sta 4-((2',4'-dimetoksifenyyli)-(Fmoc-amino)-metyyli)-fenoksihartsia (Rink-hartsia) (Novabiochem, Bad Soden, Saksa, tuoteluettelon nro: 01-64-0013), jonka substituutiokapasiteetti oli 0,39 mmol/g käyttäen menetelmää, joka oli samanlainen kuin esimerkissä 1 kuvattu menetelmä.

Tulokseksi saadun peptidihartsin 300 mg:n suuruista erää (0,096 mmol) sekoitettiin 18 h 10 ml:ssa DMF:ää seoksen kanssa, joka sisälsi 54 mg ftaloyyli-2-aminometyylibentsoehappoa (0,192 mmol), 182 mg HBTU:ta (0,480 mmol) ja 164 µl DIEA:ta (0,96 mmol).

Kun hartsi oli pesty DMF:llä, DCM:n ja MeOH:n suhteessa 6 : 4 valmistetulla seoksella ja DCM:llä ja kuivattu vakuumissa, niin (ftaloyyli-2-aminometyylibentsoyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2 irrotettiin 290 mg:sta peptidihartsia sekoittamalla tätä 180 minuuttia huoneenlämmössä seoksen kanssa, jonka koostumus oli 3 ml TFA, 225 mg fenolia, 75 µl etaaniditiolia, 150 µl tioanisolia ja 150 µl H_2O:ta. Pilkkomisseos suodatettiin, jäljellä oleva hartsi pestiin 1 ml:lla TFA:ta ja suodos konsentroitiin noin 1 ml:ksi typpivirralla. Puhdistamaton peptidi saostettiin tästä öljystä 50 ml:lla dietyylieetteriä ja pestiin 3 x 50 ml:lla dietyylieetteriä. Saostuma liuotettiin sitten 50 ml:aan H_2O:ta ja lyofilisoitiin. Tulokseksi saatua jauhetta sekoitettiin tämän jälkeen 70 °C:ssa 6 h ajan 5 ml:ssa etanolia 0,5 ml:n suuruisen hydratsiinihydraattierän kanssa ja seos laimennettiin 50 ml:lla H_2O:ta ja lyofilisoitiin.

Lyofilisoitu tuote liuotettiin lisäämällä siihen 2 ml etikkahappoa, 2 ml etanolia ja 100 ml H_2O:ta ja se puhdistettiin käyttäen suoritusvaiheita, jotka olivat samanlaiset

kuin esimerkissä 1 kuvatut suoritusvaiheet. Saanto oli 9,43 mg.

RP-HPLC-analyysista A1- ja B1-olosuhteita käyttäen saatiin näitä vastaaviksi retentioajoiksi 23,22 min ja 25,05 min.

Esimerkki 61

H-Aib-Hisψ(CH_2NH)D-2Nal-D-Phe-Lys-OH

Peptidi syntetoitiin käyttäen suoritusvaiheita, jotka olivat samanlaiset kuin esimerkissä 5 kuvatut suoritusvaiheet lukuunottamatta sitä, että käytettiin 1050 mg Sasrin-hartsia (2-metoksi-4-alkoksibentsyylialkoholihartsi) (Bachem, Bubendorf, Sveitsi, tuoteluettelon nro: D-1295), jonka substituutiokapasiteetti oli 0,87 mmol/g, ja suoritusvaiheina ensimmäisen aminohapporyhmän kytkemiseksi hartsiin oli 4-dimetyyliamiinipyridiinillä katalysoitu etukäteen muodostetun symmetrisen anhydridin kytkeminen ja tämän jälkeen suoritettu jäljellä olevien hartsin OH-ryhmien peittäminen bentsoehappoanhydridillä.

Kun tulokseksi saatu raakatuote oli pilkottu 752 mg:sta peptidiä ja 7/10 siitä oli puhdistettu esimerkissä 1 kuvatulla tavalla, saatiin saannoksi 36,76 mg.

Lopputuote luonnehdittiin esimerkissä 1 kuvatulla tavalla. Käyttäen eluointiolosuhteita A1 ja B1 havaittiin näitä vastaavien retentioaikojen olevan 13,90 min ja 17,42 min.

Esimerkki 62

H-Aib-His-N-Me-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

Peptidihartsia, H-N-Me-D-2Nal-D-Phe-Lys(Cl-Z)-MBHA-hartsia, syntetoitiin MBHA-hartsista, jonka substituutiokapasiteetti oli 0,72 mmol/g, käyttäen suoritusvaiheita, jotka olivat samanlaiset kuin esimerkissä 56 kuvatut suoritusvaiheet.

458 mg tätä hartsia käytettiin sitten H-Aib-His(Bom)-N-Me-D-2Nal-D-Phe-Lys(Cl-Z)-MBHA:n synteesiin kytkemällä se Boc-His(Bom)-OH:hon ja Boc-Aib-OH:hon. N-metyloitu peptidi pilkottiin sitten 469 mg:sta tulokseksi saatua hartsia ja 1/2 raakapeptidistä puhdistettiin ja luonnehdittiin esimerkissä 7 kuvatulla tavalla. Saanto oli 23,5 mg.

RP-HPLC-analyysista A1- ja B1-olosuhteita käyttäen saatiin näitä vastaaviksi retentioajoiksi 17,62 min ja 19,95 min.

Esimerkki 63

(Furfuryyli)-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

Peptidihartsia, H-Aib-His(Trt)-D-2Nal-D-Phe-Lys(Boc)-Rink-hartsia, syntetoitiin 4-((2',4'-dimetoksifenyyli)-(Fmoc-amino)metyyli)-fenoksihartsista (Rink-hartsista) (Novabiochem, Bad Soden, Saksa, tuoteluettelon nro: 01-64-0013), jonka substituutiokapasiteetti oli 0,43 mmol/g, käyttäen suoritusvaiheita, jotka olivat samanlaiset kuin esimerkissä 1 kuvatut suoritusvaiheet.

Tämän jälkeen 300 mg tulokseksi saatua peptidihartsia sekoitettiin 5 ml:n suuruisen DMF:ään valmistetun 1-%:isen etikkahappoerän ja 410 µl:n suuruisen furaani-2-aldehydierän kanssa. Seokseen lisättiin 15 min ja 180 min kuluttua 231 mg $NaCNBH_3$:a (85 %). Sekoitusta jatkettiin 18 h. Hartsi eristettiin suodattamalla ja pestiin DMF:llä, DCM:n ja MeOH:n suhteessa 6 : 4 valmistetulla seoksella ja DCM:llä.

N-alkyloitu peptidi pilkottiin 319 mg:sta tulokseksi saatua hartsia, puhdistettiin ja luonnehdittiin esimerkissä 1 kuvatulla tavalla. Saanto oli 44,8 mg.

RP-HPLC-analyysista A1- ja B1-olosuhteita käyttäen saatiin näitä vastaaviksi retentioajoiksi 19,45 min ja 22,23 min.

Esimerkki 64

N,N-di-(2R-hydroksipropyyli)-3-aminometyylibentsoyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

Peptidihartsia, (3-aminometyylibentsoyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys(Cl-Z)-MBHA-hartsia, syntetoitiin 4-metyylibentshydryyliamiini (MBHA) -hartsista (Bissendorf Biochemicals, Hannover, Saksa, tuoteluettelon nro: RMIS50), jonka substituutiokapasiteetti oli 0,72 mmol/g, käyttäen suoritusvaiheita, jotka olivat samanlaiset kuin esimerkissä 7 kuvatut suoritusvaiheet.

500 mg:n suuruista erää tulokseksi saatua peptidihartsia sekoitettiin sitten 12,5 ml:n suuruisen DMF:ään valmistetun 1-%:isen etikkahappoerän ja 410 µl:n suuruisen 2(R)-(tetrahydropyran-2(R,S)-yylioksi)propanaalierän kanssa. Seokseen lisättiin 5 minuutin kuluttua 213 mg $NaCNBH_3$:a (85 %). Sekoitusta jatkettiin 18 h. Hartsi eristettiin suodattamalla ja pestiin DMF:llä, DCM:n ja MeOH:n suhteessa 6 : 4 valmistetulla seoksella ja DCM:llä.

N,N-dialkyloitu peptidi pilkottiin 490 mg:sta tulokseksi saatua hartsia, puhdistettiin ja luonnehdittiin esimerkissä 7 kuvatulla tavalla. Saanto oli 20,72 mg.

RP-HPLC-analyysista A1- ja B1-olosuhteita käyttäen saatiin näitä vastaaviksi retentioajoiksi 23,40 min ja 25,33 min.

Esimerkit 65 - 110

Esimerkki	Peptidi	Valmistettu suoritusvaiheilla, jotka vastaavat esimerkkiä	A1-olosuhdetta vastaava RP-HPLC-retentioaika (esim. 1)	B1-olosuhdetta vastaava RP-HPLC-retentioaika (esim. 1)
65	H-Ala-N-Me-(2-aminobentsoyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2	7	24,47	26,27
66	(4-aminometyylibentsoyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2	1	22,22	23,5
67	H-His-Ala-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2	1	19,90	21,45
68	(2S)-(H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-NH)-1,6-diaminoheksaani	8	17,05	19,07
69	4-(H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-NH)butyyliamiini	3	18,65	20,08
70	3-(H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-NH)-propyyliamiini	3	18,42	19,80
71	(3-aminometyylibentsoyyli)-D-hPhe-D-Phe-Lys-NH_2	7	20,33	21,95
72	(3-aminometyylibentsoyyli)ψ-(CH_2NH)D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2	5	14,17	17,23
73	(3-aminometyylibentsoyyli)-D-2Nal-D-hPhe-Lys-NH_2	7	25,30	26,58
74	(3-amino-3-metyyli-butanoyyli)-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2	58	18,12	20,20
75	(3-aminometyylibentsoyyli)-D-2Nal-N-Bzl-Gly-Lys-NH_2	7	25,33	26,70

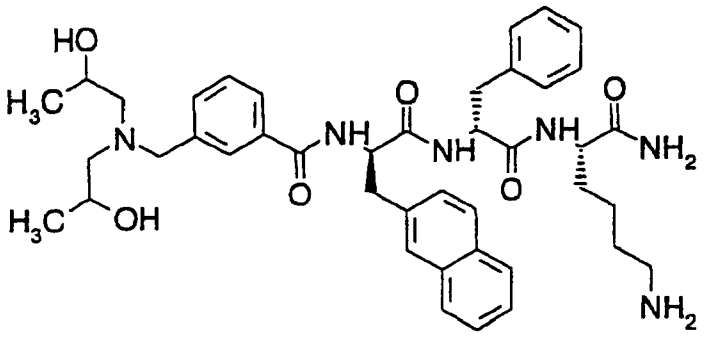
76	(2S)-((3-aminometyylibentsoyyli)-D-2Nal-D-Phe-NH)-6-aminoheksanoli	4	22,95	24,32
77	(3-aminometyylibentsoyyli)-D-2Nal-D-Thial-Lys-NH_2	7	22,13	23,23
78	(2S)-(H-Aib-Hisψ(CH_2NH)D-2Nal-D-Phe-NH)-6-aminoheksanoli	59	12,83	17,27
79	(3-aminometyylibentsoyyli)-D-2Nal-D-3Pyal-Lys-NH_2	1	15,10	16,87
80	(3-aminometyylibentsoyyli)-D-2Nal-D-Phe(4-F)-Lys-NH_2	7	23,40	24,63
81	(3-aminometyylibentsoyyli)-D-2Nal-D-Phe(4-OMe)-Lys-NH_2	7	22,50	23,90
82	2-(H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-NH)etaani	3	18,30	20,47
83	H-Aib-Phe-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2	1	29,25	30,55
84	2-(H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-NH-(1-metyyli-2-pyrrolidinyyli)etaani	3	18,70	20,80
85	2-(H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-NH)-(2-pyridyyli)etaani	3	19,20	20,83
86	(3-aminometyylibentsoyyli)-D-2Nal-N-Me-D-Phe-Lys-NH_2	1	26,78	27,88
87	H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-Gly-NH_2	1	20,48	22,23
88	H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-Ala-NH_2	1	21,65	23,38
89	H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-Orn-NH_2	1	18,43	20,05
90	(5-aminometyylitienyyli-2-karbonyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2	1	22,32	23,65

91	H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-D-Lys-NH_2	1	18,50	20,00
92	H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-Dab-NH_2	1	17,75	19,48
93	H-Aib-His-D-2Nal-D-Pheψ(CH_2-NH)Lys-NH_2	5	18,57	20,62
94	H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-N-Me-Lys-NH_2	62	18,03	20,60
95	(3-aminometyylitienyyli-2-karbonyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2	1	23,23	24,78
96	H-Aib-His-D-2Nal-N-Me-D-Phe-Lys-NH_2	1	21,78	23,53
97	H-Aib-I-Es-D-2Nal-D-Phe-Lys-N(Me)$_2$	3	18,70	21,07
98	(3-aminometyylibentsoyyli)-D-1Nal-D-Phe-Lys-NH_2	1	22,67	24,23
99	H-Aib-His-D-2Nal-D-Trp-Lys-NH_2	1	18,17	20,40
100	(2-pyridyylimetyyli)-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2	63	19,07	21,73
101	H-Aib-(3-aminometyylibent-soyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2	7	23,95	25,38
102	H-Aib-3Pyal-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2	1	18,53	20,38
103	(3R)-piperidiinikarbonyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2	1	21,52	22,97
104	(2-(H-Aib-His-D-2Nal-NH)-etyyli)bentseeni	3	25,55	27,85
105	(2R-hydroksipropyyli)-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2	64	18,15	20,28
106	(3-aminometyylibentsoyyli)-D-2Nal-D-Pheψ(CH_2NH)Lys-NH_2	51	22,00	23,95

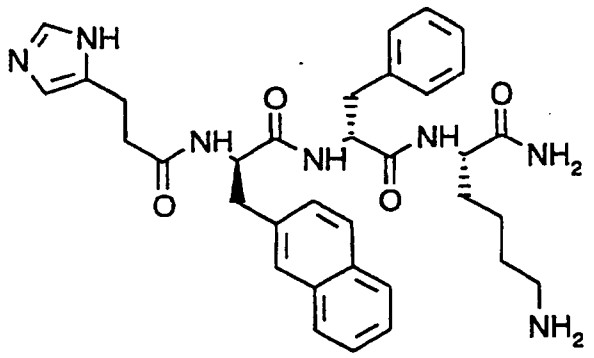
107	(3-aminometyylibentsoyyli)-N-Me-D-2Nal-D- Phe-Lys-NH_2	62	23,27	24,72
108	(3-aminometyylibentsoyyli)-D-2Nal-D-Phe-N-Me-Lys-NH_2	67	22,60	23,98
109	H-D-Thr-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2	7	17,75	19,83
110	H-Hyp-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2	7	17,58	19,37

Tämän keksinnön mukaisten edustavien peptidien rakenteet on esitetty alla.

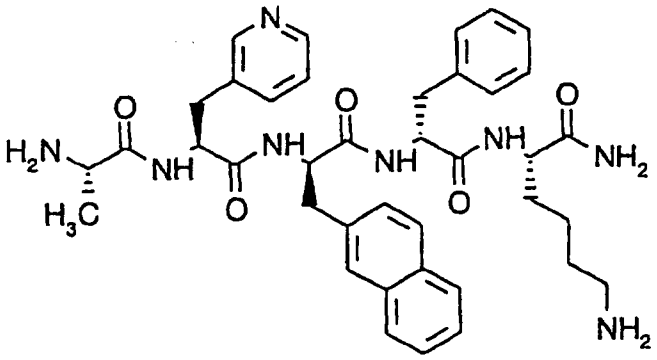
N,N-di-2R-hydroksipropyyli)-(3-aminometyylibentsoyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2



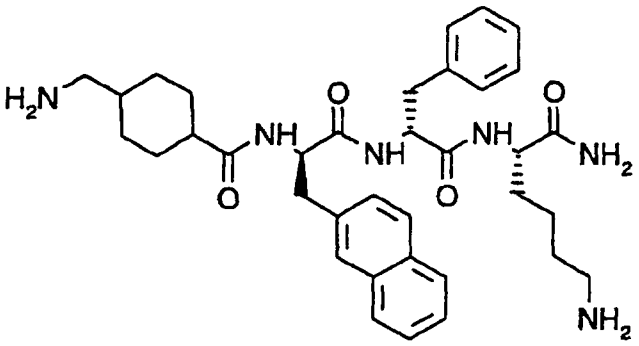
3-(4-imidatsolyyli)propionyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2.



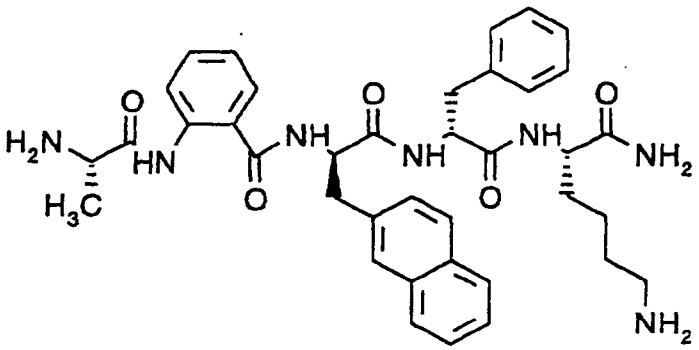
H-Ala-3Pyal-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2



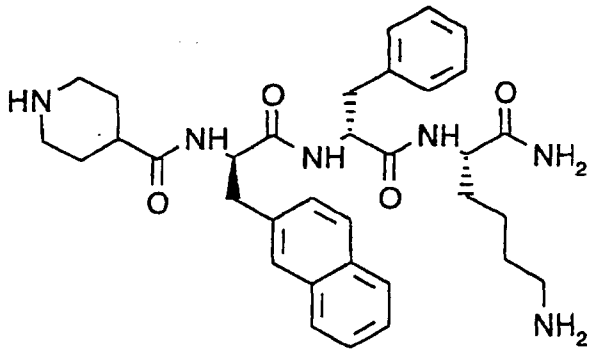
(Trans-4-aminometyylisykloheksanoyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2



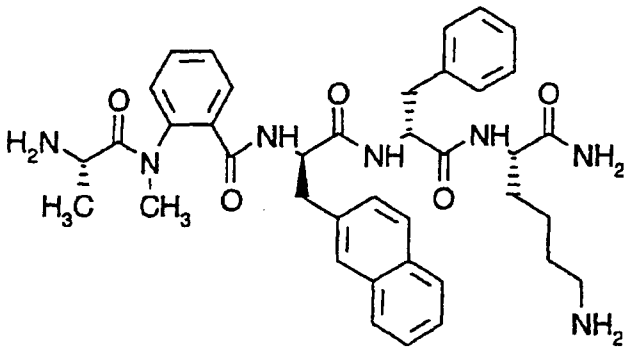
H-Ala-(2-(2-aminobentsoyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2



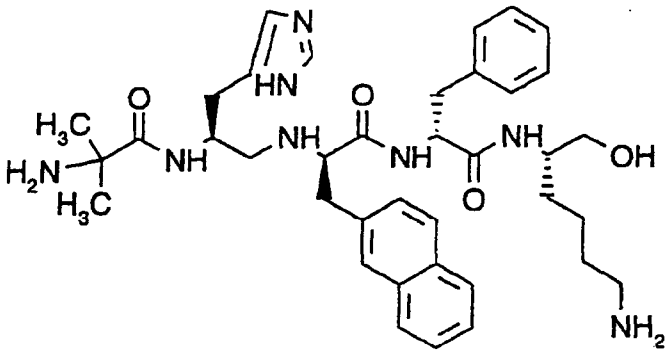
(3R)-piperidiinikarbonyyli-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2



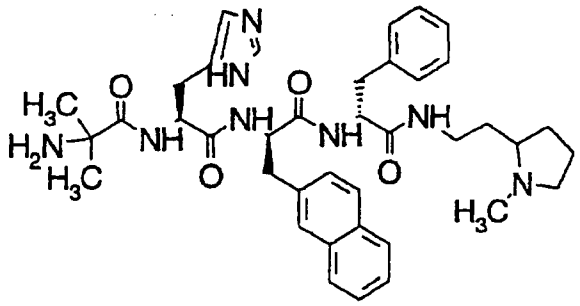
H-Ala-N-Me-(2-aminobentsoyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2



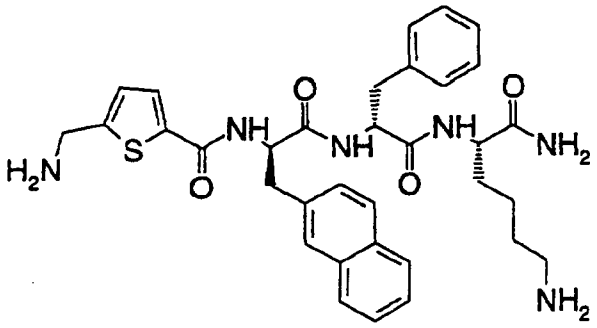
(2S)-(H-Aib-Hisψ(CH_2NH)D-2Nal-D-Phe-NH)-6-aminoheksanoli



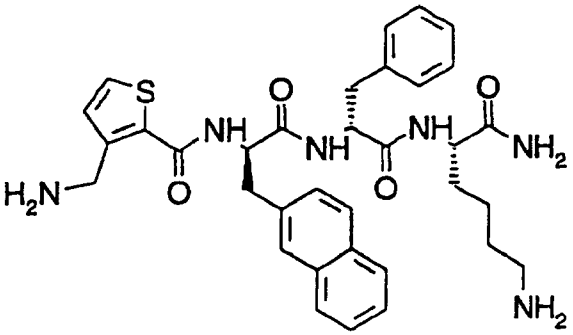
2-(H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-NH)(1-metyyli-2-pyrrolidinyyli)-etaani



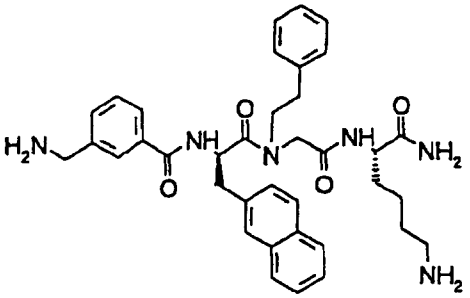
(5-aminometyylitienyyli-2-karbonyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2



(3-aminometyyli-tienyyli-2-karbonyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2



(3-aminometyylibentsoyyli)-D-2Nal-N-(fenetyyli)-Gly-Lys-NH_2



Esimerkki 116

GH:n erittymistä edistävien erilaisten yhdisteiden vaikutusten tutkimiseksi luotiin in vitro -olosuhteissa suoritettava määritys, jossa käytettiin hyväksi rotan aivolisäkkeen soluja. Aivolisäkkeen sekasoluviljelmä eristettiin koiraspuolisten rottien aivolisäkkeen etulohkosta ja sitä viljeltiin 3 päivää. Soluja stimuloitiin pesun jälkeen 15 minuutin ajan ja erittyneen GH:n määrä määritettiin soluviljelmäsupernatantista.

Rotan aivolisäkkeen solujen eristäminen oli muunnelma Sartor, O., et al.':n, Endocrinology 116 (1985) 952 - 957, menetelmästä. Aivolisäkkeet poistettiin dekapitoinnin jälkeen 250 g:n painoisista koiraspuolisesta Sprague-Dawley-rotista. Neuraaliset välilohkot poistettiin ja jäljellä oleva osa pantiin Greyn mediumiin, jota oli täydennetty 0,25-%:isella glukoosilla, 2 x ei-välttämättömillä aminohapoilla ja 1-%:isella BSA:lla (eristyspuskuri). Rauhaset pilkottiin pieniksi kappaleiksi ja nämä siirrettiin pulloon, joka sisälsi 3 ml eristyspuskuria + 11,5 mg trypsiiniä ja 1000 μg DNaasia, ja seosta inkuboitiin 35 minuuttia 37 °C:ssa 95-%:isessa O_2:ssa ja ravistelunopeudella 70 pyörähdystä minuutissa. Fragmentteja pestiin 3 kertaa sedimentoimalla ne eristyspuskurissa ja ne aspiroitiin pasteurpipettiä käyttäen yksittäisiksi soluiksi. Kun solut oli dispergoitu, ne suodatettiin pilkkoutumattoman kudoksen poistamiseksi nylonsuodattimen (160 μm) läpi. Solut pestiin 3 kertaa eristyspuskurilla, jota oli täydennetty trypsiini-inhibiittorilla (0,75 mg/ml), ja ne suspendoitiin uudelleen solutiheyteen 2 x 10^5 solua/ml viljelymediumiin (DMEM, jota oli täydennetty seoksella, jonka koostumus oli HEPES, 25 mM, glutamiini, 4 mM, natriumvetykarbonaatti, 0,75 %, FCS, 2,5 %, hevosen seerumi, 3 %, rotan seerumi, 10 %, T_3, 1 nM ja deksametasoni, 40 μg/l). Solut lisättiin kasvatusta varten mikrotiitterilevyille 200 μl kuoppaa kohti ja niitä viljeltiin 3 päivää 37 °C:ssa ja 8-%:isessa CO_2:ssa.

Solut pestiin viljelyn jälkeen kaksi kertaa stimulointipuskurilla (HBSS, jota oli täydennetty 1-%:isella BSA:lla, 0,25-%:isella D-glukoosilla ja 25 mM Hepes'illa) ja niitä esi-inkuboitiin 1 tunnin ajan. Tämän jälkeen puskuri poistettiin ja kuoppaan lisättiin peptidiä sisältävää uutta stimulointipuskuria ja levyjä inkuboitiin 15 minuuttia 37 °C:ssa ja 5-%:isessa CO_2:ssa. Medium koottiin talteen ja siitä analysoitiin rotan kasvuhormonin (rGH) pitoisuus säteilylähteen läheisyyteen perustuvassa nestetuikemäärityksessä (SPA) seuraavalla tavalla [SPA suoritettiin olennaisesti julkaisuissa US 4 568 649, Hart ja Greenwalt, Mol. Immunol. 16 (1979) 265 - 269 tai Udenfriend, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985) 8672 - 8676 kuvatulla tavalla].

rGH-määritys suoritettiin OptiPlates-levyllä (96-kuoppaisilla levyillä), jotka soveltuvat suoraan laskentaan Packard'in TopCount-laitteessa (β-tuikelaskija).

Määrityksen suoritusvaiheet:

40 μl puskuria

10 μl näytettä (inkuboitua stimulaatiopuskuria)

50 μl ^{125}I-rGH:ta

50 μl kaniinin anti-rGH:ta

50 μl SPA-reagenssia (kaniinia vastaan suunnattu vasta-aine).

Levyt suljetaan umpeen ja ne asetetaan levyjen ravistimeen 30 minuutin ajaksi, minkä jälkeen levyjä inkuboidaan 10 tuntia ja niiden annetaan laskeutua 10 - 15 °C:ssa ja suoritetaan laskenta.

SPA:ssa saatetaan kaniinissa valmistettuun anti-GH-vasta-aineeseen (primäärinen vasta-aine) sitoutunut rGH reagoimaan fluomikrosfääreihin sitoutuneen toisen vasta-aineen kanssa (SPA tyypin II RIA, joka on saatavilla Amersham-yhtiöstä). Kaikki primääriseen vasta-aineeseen sitoutunut radioaktiivi-

sella leimalla varustettu rGH immobilisoituu fluomikrosfääreihin, jotka tämän jälkeen tuottavat valoa. Määritys β-tuikelaskijassa tekee mahdolliseksi laskea radioaktiivisella leimalla varustetun rGH:n määrän. Fluomikrosfääreihin sitoutuneen radioaktiivisella leimalla varustetun rGH:n määrä pienenee näytteessä olevan rGH-pitoisuuden noustessa.

Esim. nro	Yhdiste	EC_{50}	E_{max} (% GHRP-6:sta)
3	H-Ala-His-D-2Nal-DPhe-NH-$(CH_2)_5$-NH_2	20	100
10	H-Ala-Phe-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2	2	90
51	H-Ala-His-D-1Nal-D-Phe-Lys-NH_2	10	85
76	(2S)-((3-aminometyylibentsoyyli)-D2Nal-D-Phe-NH)-6-aminoheksanoli	26	65
83	H-Aib-Phe-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2	8	75
88	H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-Ala-NH_2	11	80
104	(2-(H-Aib-His-D-2Nal-NH)etyyli)-bentseeni	58	85

Patenttivaatimukset

1. Yhdiste, jolla on yleinen kaava I

$$A - B - C - D\ (-E)_p$$

jossa p on 0 tai 1;

A on vety tai $R^1-(CH_2)_q-(X)_r-(CH_2)_s-CO-$, jossa

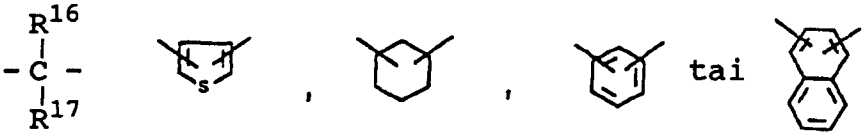
q on 0 tai alueelta 1 - 5 oleva kokonaisluku;

r on 0 tai 1;

s on 0 tai alueelta 1 - 5 oleva kokonaisluku;

R^1 on vety, imidatsolyyli, guanidiini, piperatsiini, morfoliini, piperidiini tai $N(R^2)-R^3$, jossa R^2 ja R^3 ovat kumpikin toisistaan riippumatta vety tai alempialkyyli, jotka on mahdollisesti substituoitu yhdellä tai useammalla hydroksyyli-, pyridinyyli- tai furanyyliryhmällä; ja

X, silloin kun r on 1, on $-NH-$, $-CH_2-$, $-CH=CH-$,



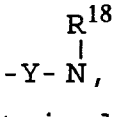
jossa R^{16} ja R^{17} ovat kumpikin toisistaan riippumatta vety tai alempialkyyli; B on $(G)_t-(H)_u$, jossa

t on 0 tai 1;

u on 0 tai 1;

G ja H ovat aminohapporyhmiä, jotka ovat luonnosta peräisin olevia L-aminohappoja tai niitä vastaavia D-isomeeerejä tai aminohappoja, joita ei esiinny luonnossa, kuten 1,4-diaminovoihappo, aminoisovoihappo, 1,3-diaminopropionihappo, 4-aminofenyylialaniini, 3-pyridyylialaniini, 1,2,3,4-tetrahydroisokinoliini-3-karboksyylihappo, 1,2,3,4-tetrahydronorharmaani-3-karboksyylihappo, N-metyyliantraniilihappo, antraniilihappo, N-bentsyyliglysiini, 3-amino-3-metyylibentsoehappo, 3-amino-3-metyylibutaanihappo, sarkosiini, nipekotiinihappo tai isonipekotiinihappo;

ja jossa silloin kun sekä t että u ovat 1, on amidisidos G:n ja H:n välillä mahdollisesti substituoitu ryhmällä

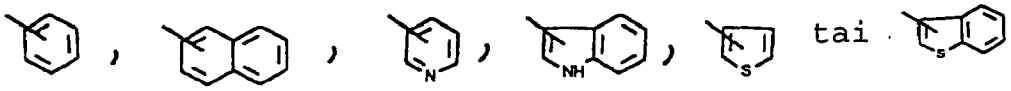


-Y-N, jossa Y on >C=O tai CH$_2$, ja R^{18} on vety, alempialkyyli tai alempiaralkyyli;

C on D-aminohappo, jolla on kaava -NH-CH($(CH_2)_w$-R^4)-CO-, jossa

w on 0, 1 tai 2; ja

R^4 on



joista kukin on mahdollisesti substituoitu halogeenilla, alempialkyylillä, alempialkyylioksilla, alempialkyyliaminolla, aminolla tai hydroksilla;

D, silloin kun p on 1, on D-aminohappo, jolla on kaava: -NH-CH($(CH_2)_k$-R^5)-CO- tai silloin kun p on 0, niin

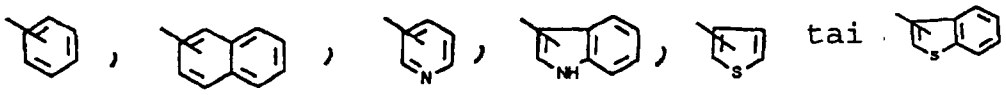
D on $-NH-CH((CH_2)_l-R^5)-CH_2-R^6$ tai $-NH-CH((CH_2)_m-R^5)-CO-R^6$, jossa

k on 0, 1 tai 2;

l on 0, 1 tai 2;

m on 0, 1 tai 2;

R^5 on



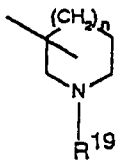
joista kukin on mahdollisesti substituoitu halogeenilla, alkyylilla, alkyylioksilla, aminolla tai hydroksilla; ja

R^6 on piperatsiini, morfoliini, piperidiini, -OH tai $-N(R^7)-R^8$, jossa R^7 ja R^8 ovat kumpikin toisistaan riippumatta vety tai alempialkyyli;

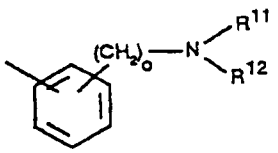
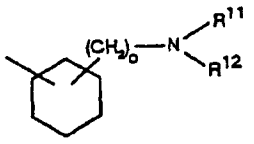
E, silloin kun p on 1, on $-NH-CH(R^{10})-(CH_2)_v-R^9$, jossa

v on 0 tai alueelta 1 - 8 oleva kokonaisluku;

R^9 on vety, imidatsolyyli, guanidiini, piperatsiini, morfoliini, piperidiini,

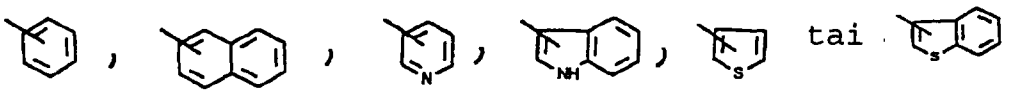


jossa n on 0, 1 tai 2, ja R^{19} on vety tai alempialkyyli,


tai


jossa o on alueelta 1 - 3 oleva kokonaisluku,

tai $N(R^{11})-R^{12}$, jossa R^{11} ja R^{12} ovat kumpikin toisistaan riippumatta vety tai alempialkyyli, tai



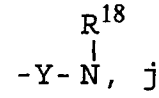
joista kukin on mahdollisesti substituoitu halogeenilla, alkyylillä, alkyylioksilla, aminolla, alkyyliaminolla, hydroksilla tai Amadorin toisiintumistuotteella, joka on muodostunut aminoryhmästä ja heksapyranoosista tai heksapyranosyyliheksapyranoosista

ja

R^{10}, silloin kun p on 1, on -H, -COOH, $-CH_2-R^{13}$, $-CO-R^{13}$ tai $-CH_2-OH$, jossa

R^{13} on piperatsiini, morfoliini, piperidiini, -OH tai $-N(R^{14})-R^{15}$, jossa R^{14} ja R^{15} ovat kumpikin toisistaan riippumatta vety tai alempialkyyli;

B:n ja C:n välinen amidisidos, tai silloin kun t ja u ovat kumpikin 0, A:n ja C:n välinen amidisidos, on mahdollisesti korvattu ryhmällä



jossa Y on >C=O tai CH_2 ja R^{18} on vety, alempialkyyli tai alempiaralkyyli,

tai silloin kun p on 1, niin ryhmien D ja E välinen amidisidos on mahdollisesti korvattu ryhmällä, joka on



-Y-N, jossa Y ja R^{18} ovat edellä olevan kuvauksen mukaiset; tai tämän farmaseuttisesti hyväksyttävä suola.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdiste, **tunnettu** siitä, että p on 1.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdiste, **tunnettu** siitä, että A on vety.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdiste, **tunnettu** siitä, että A on R^1-$(CH_2)_q$-$(X)_r$-$(CH_2)_s$-CO-, jossa R^1 on 3-imidatsolyyli, q on 2, r on 0 ja s on 0; tai jossa R^1 on NH_2, q on 1, r on 1, X on disubstituoitu bentseeni, joka on edullisesti substituoitu 1- ja 3-asemista, ja s on 0; tai jossa R^1 on NH, q on 1, r on 1, X on disubstituoitu tiofeeni, joka on edullisesti substituoitu 3- ja 2-asemista, ja s on 0.

5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdiste, **tunnettu** siitä, että silloin kun t on 1 niin G on Ala, Gly, Aib, sarkosiini, nipekotiinihappo tai isonipekotiinihappo.

6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdiste, **tunnettu** siitä, että silloin kun u on 1 niin H on His, Phe, Tic, 3Pyal, Gly, Ala, Phe(4-NH_2), Sar, Pro, Tyr, Arg, Orn, 3-aminometyylibentsoehappo tai D-Phe.

7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdiste, **tunnettu** siitä, että R^4 on 2-naftyyli.

8. Patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdiste, **tunnettu** siitä, ett R^5 on fenyyli.

9. Patenttivaatimuksen 2 mukainen yhdiste, **tunnettu** siitä, että v on 2 - 6, ja R^9 on $-NH_2$, morfoliinipropyyli, morfoliinietyyli tai (1-metyylipyrrolidinyyli)etyyli.

10. Patenttivaatimuksen 2 mukainen yhdiste, **tunnettu** siitä, että R^{10} on -COOH, CH_2-OH, -H tai $CONH_2$.

11. Patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdiste, **tunnettu** siitä, että se on

H-Ala-Hisψ(CH_2NH)D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

H-Ala-Ala-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

H-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

(3-(4-imidatsolyyli)propionyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

H-D-Lys-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

H-5Apent-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

H-D-Ala-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

H-5Apent-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

(n-propyyli)-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

H-Ala-3Pyal-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

H-Ala-Phe(4-NH_2)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

H-D-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

(2-(4-imidatsolyyli)asetyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

(3-(4-imidatsolyyli)akryloyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

(3-aminometyylibentsoyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

(3-aminofenyyliasetyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

(4-aminofenyyliasetyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

(3-aminokrotonoyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

(4-piperidiinikarboksyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-NH_2

(H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-NH)heksaani

6-(H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-NH)heksyyliamiini

5-(H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-NH)pentyyliamiini

H-Ala-His-D-2Nal-D-Pheψ(CH_2NH)Lys-NH_2

H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-OH

(2S)-(H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-NH)-6-aminoheksanoli

(2-(H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-NH)etyyli)bentseeni

2-(H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-NH)etyyliamiini

4-((H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-NH)metyyli)bentsyyliamiini

H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-Lys(maltosyyli)-NH_2

H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-Phe-NH_2

H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-D-Phe-NH_2

H-Ala-His-D-Phe-D-Phe-Lys-NH_2

H-Ala-His-D-Trp-D-Phe-Lys-NH_2

H-His-D-2Nal-D-Trp-Lys-NH_2

H-Ala-His-D-1Nal-D-Phe-Lys-NH_2

H-Ala-Phe-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-Lys(maltosyyli)-NH_2

(2R)-(H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH)-3fenyylipropyyliamiini

H-Ala-N-Me-(2-aminobentsoyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

(3-(metyyliaminometyyli)bentsoyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

(4-(aminometyyli)bentsoyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

H-His-Ala-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

4-(H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-NH)butyyliamiini

3-(H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-NH)propyyliamiini

(3-(dimetyyliaminometyyli)bentsoyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

(3-amino-3-metyylibutanoyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

(3-aminometyylibentsoyyli)-D-hPhe-D-Phe-Lys-NH_2

(3-aminometyylibentsoyyli)ψ(CH_2NH)D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

(3-aminometyylibentsoyyli)-D-2Nal-D-hPhe-Lys-NH_2

(3-amino-3-metyylibutanoyyli)-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

(3-aminometyylibentsoyyli)-D-2Nal-N-Bzl-Gly-Lys-NH_2

(2S)-(3-aminometyylibentsoyyli)ψ(CH_2NH)-D-2Nal-D-Phe-NH)-6-aminoheksanoli

(2S)-((3-aminometyylibentsoyyli)-D-2Nal-D-Phe-NH)-6-aminoheksanoli

(3-aminometyylibentsoyyli)-D-2Nal-D-Thial-Lys-NH_2

(2S)-(H-Aib-Hisψ(CH_2NH)-D-2Nal-D-Phe-NH)-6-aminoheksanoli

(3-Aminometyylibentsoyyli)-D-2Nal-D-3Pyal-Lys-NH_2-

(3-aminometyylibentsoyyli)-D-2Nal-D-Phe(4-F)-Lys-NH_2

(3-aminometyylibentsoyyli)-D-2Nal-D-Phe(4-OMe)-Lys-NH_2

(2-aminometyylifenyyliasetyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

(2-aminometyylibentsoyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

2-(H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-NH)-(4-pyridyyli)etaani

H-Aib-Phe-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

2-(H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-NH)-(1-metyyli-2-pyrrolidinyyli)-etaani

2-(H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-NH)-(4-pyridyyli)etaani

H-Aib-Hisψ(CH_2NH)-D-2Nal-D-Phe-Lys-OH

(3-aminometyylibentsoyyli)-D-2Nal-N-Me-D-Phe-Lys-NH_2

H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-Gly-NH_2

H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-Ala-NH_2

H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-Orn-NH_2

(5-aminometyylitienyyli-2-karbonyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-D-Lys-NH_2

H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-Dab-NH_2

H-Aib-His-D-2Nal-D-Pheψ(CH_2NH)-Lys-NH_2

H-Aib-His-N-Me-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-N-Me-Lys-NH_2

(3-aminometyylitienyyli-2-karbonyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

H-Aib-His-D-2Nal-N-Me-D-Phe-Lys-NH_2

H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-N(Me)$_2$

(3R)-piperidiinikarbonyyli-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

(3S)-piperidiinikarbonyyli-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

(3-aminometyylibentsoyyli)-D-1Nal-D-Phe-Lys-NH_2

H-Aib-His-D-2Nal-D-Trp-Lys-NH_2

(Furfuryyli)-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

(2-pyridyylimetyyli)-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

H-Aib-(3-aminometyylibentsoyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

H-Aib-3Pyal-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

(3S)-piperidiinikarbonyyli-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

(3R)-piperidiinikarbonyyli-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

(2-(H-Aib-His-D-2Nal-NH)etyyli)bentseeni

N,N-di(2R-hydroksipropyyli)-(3-aminometyylibentsoyyli)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

(2R-hydroksipropyyli)-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

(3-aminometyylibentsoyyli)-D-2Nal-D-Pheψ(CH_2NH)Lys-NH_2

(3-aminometyylibentsoyyli)-N-Me-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

(3-aminometyylibentsoyyli)-D-2Nal-D-Phe-N-Me-Lys-NH_2

H-D-Thr-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

H-Aib-His-D-2Nal-N-(fenetyyli)-Gly-Lys-NH_2

(3-aminometyylibentsoyyli)-D-2Nal-N-(fenetyyli)-Gly-Lys-NH_2

H-Hyp-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH_2

H-Aib-His-N-Me-D-2Nal-N-(fenetyyli)-Gly-Lys-NH_2

H-Aib-His-N-Me-D-2Nal-N-Me-D-Phe-Lys-NH_2

H-Aib-His-D-2Nal-D-Pheψ(CH_2N(Me))Lys-NH_2

3-(H-Aib-His-D-2Nal-N-Me-D-Phe-NH)morfoliinipropaani

2-(H-Aib-His-D-2Nal-N-Me-D-Phe-NH)-(1-metyyli-2-pyrrolidinyyli)etaani

(3R)-piperidiinikarbonyyli-N-Me-D-2Nal-N-Me-D-Phe-Lys-NH_2

3-((aminometyylibentsoyyli)-D-2Nal-N-Me-D-Phe-NH)-morfoliinipropaani

2-(H-Aib-His-N-Me-D-2Nal-N-Me-D-Phe-NH)-(1-metyyli-2-pyrrolidinyyli)etaani

2-(3R)-piperidiinikarbonyyli-N-Me-D-2Nal-N-Me-D-Phe-NH)-(1-metyyli-2-pyrrolidinyyli)etaani

2-(3-aminometyylibentsoyyli)-N-Me-D-2Nal-N-Me-D-Phe-NH)-(1-metyyli-2-pyrrolidinyyli)etaani

3-(H-Aib-His-N-Me-D-2Nal-N-Me-D-Phe-NH)morfoliinipropaani

3-((3R)-piperidiinikarbonyyli-N-Me-D-2Nal-N-Me-D-Phe-NH)morfoliinipropaani

3-((3-aminometyylibentsoyyli)-N-Me-D-2Nal-N-Me-D-Phe-NH)morfoliinipropaani

H-Aib-His-D-2Nal-N-Me-D-Phe-Hyp-NH_2

2-((3-aminometyylibentsoyyli)-D-2Nal-N-Me-D-Phe-NH)-(1-metyyli-2-pyrrolidinyyli)etaani

2-((3R)piperidiinikarbonyyli-D-2Nal-N-Me-D-Phe-NH)-(1-metyyli-2-pyrrolidinyyli)etaani.

12. Farmaseuttinen koostumus, **tunnettu** siitä, että se sisältää aktiivisena ainesosana yleisen kaavan I mukaista yhdistettä tai tämän farmaseuttisesti hyväksyttävää suolaa sekä farmaseuttisesti hyväksyttävää kantaja-ainetta tai laimenninta.

13. Patenttivaatimuksen 12 mukainen kerta-annoslääkemuodossa oleva koostumus, **tunnettu** siitä, että se sisältää noin 10 - noin 200 mg yleisen kaavan I mukaista yhdistettä tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävää suolaa.

14. Farmaseuttinen koostumus, joka on tarkoitettu stimuloimaan kasvuhormonin vapautumista aivolisäkkeestä, **tunnettu** siitä, että koostumus sisältää aktiivisena ainesosana yleisen kaavan I mukaista yhdistettä tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävää suolaa farmaseuttiseen kantaja-aineeseen tai laimentimeen yhdistettynä.

15. Menetelmä, jolla on tarkoitus stimuloida kasvuhormonin vapautumista aivolisäkkeestä, **tunnettu** siitä, että menetelmä käsittää sen, että annetaan tehokas määrä yleisen kaavan I mukaista yhdistettä tai tämän farmaseuttisesti hyväksyttävää suolaa potilaalle, joka on tämän tarpeessa.

16. Patenttivaatimuksen 15 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että yleisen kaavan I mukaisen yhdisteen tai tämän farmaseuttisesti hyväksyttävän suolan tai esterin tehokas määrä on noin 0,000 1 - noin 100 mg ruumiinpainokiloa kohti päivässä, ja edullisesti noin 0,001 - noin 50 mg ruumiinpainokiloa kohti päivässä.

17. Yleisen kaavan I mukaisen yhdisteen tai tämän farmaseuttisesti hyväksyttävän suolan käyttö sellaisen lääkkeen valmistamiseen, joka on tarkoitettu stimuloimaan kasvuhormonin vapautumista aivolisäkkeestä.