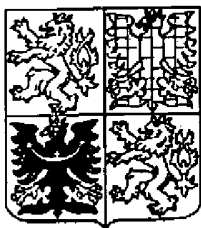


ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(21) 853-93

(13) A3

5(51)

C 07 K 7/26

A 61 K 37/43

(22) 13.11.91

(32) 13.11.91, 14.11.90

(31) 91US/9108248, 90/614170

(33) WO, US

(40) 16.03.94

(71) The Upjohn Company, Kalamazoo, Michigan, US;

(72) Friedman Alan R., Portage, Michigan, US;

(54) **Stabilizované účinné analogy faktorů
uvolňujících růstový hormon**

(57) Peptidy uvolňující růstový hormon, s Val nebo Ile místo zbytku aminokyseliny v poloze 19 a Gly, Thr nebo Ile v poloze 2 a Ala, Val, Leu, Ile nebo Gly v poloze 15 jsou stabilnější a účinnější než přírodní peptidy při uvolňování růstového hormonu z hypofýzy. Využití mají v lékařství a chovu dobytka.

Stabilizované účinné analogy faktorů uvolňujících růstový hormon.

Ph.D.	URAD PROJEKTU VE ŠTĚPĚ VÁSTNĚ CTVĚ	0. V. 93	00510	228037	20
-------	--	----------	-------	--------	----

Oblast techniky

Vynález se týká peptidů ovlivňujících činnost podvěsku mozkového u lidí a jiných živočichů, především savců. Jmenovitě je tento vynález zaměřen na peptidy, které podporují uvolňování růstového hormonu hypofýzou. Peptidy podle tohoto vynálezu jsou účinné in vivo, stálejší v plazmě a vybrané peptidy jsou stálejší i ve vodném prostředí při neutrálním pH než přirozené řetězce těchto látek.

Dosavadní stav techniky

Fyziologové věděli již dávno, že hypothalamus kontroluje činnost adenohypofýzy tak, že hypothalamus produkuje zvláštní látky, které povzbuzují nebo inhibují vylučování různých hormonů. V roce 1982 byly izolovány z lidských tumorů slinivky lidské pankreatické (rakovinné) faktory (hpGRF). Byly vyčištěny, charakterizovány, syntetizovány a zjistilo se, že podněcují uvolňování růstového hormonu (GH) hypofýzou. Guillemin R., a j.: Science 218, 585-585(1982). Od té doby byly též charakterizovány a syntetizovány odpovídající hypothalamické faktory uvolňující GH (GRF) u jiných druhů, včetně krys, vepřů, ovcí, skotu a koz i lidí.

Bylo zjištěno, že lidský hypothalamický GRF (hGRF) má stejné složení jako phGRF a to: H-Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-Ser-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Ser-Asn-Gln-

Glu-Arg-Gly-Ala-Arg-Ala-Arg-Leu-NH₂.

Kryší GRF (rGRF) má, jak bylo zjištěno, skupinu Ser v poloze 8 a vzorec: H-His-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Ser-Ser-Tyr-Arg-Arg-Ile-Leu-Gly-Gln-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-His-Glu-Ile-Met-Asn-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Glu-Gln-Arg-Ser-Arg-Phe-Asn-OH. (Viz na příklad US patent 4,595,676).

Bylo zjištěno, že hovězí GRF (bGRF) má vzorec H-Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-Asn-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-Gly-Ala-Lys-Val-Arg-Leu-NH₂.

Vepřový GRF má skupinu Ser v poloze 28.

Bylo sděleno, že přírodní řetězce GRF jsou rychle deaktivovány enzymy krevní plazmy. Rychlý rozpad je vyvolán přerušением vazby 2-3 peptidu dipeptidylpeptidázou, typ IV (DPP-IV), která byla dříve též označována jako dipeptidylaminopeptidáza-IV. Frohman, L.A. aj.: J.Clin. Invest. 78, 906-913 (1986).

Metabolická stabilita GRF a různé metody ochrany GRF peptidů proti účinku dipeptidylpeptidázy byly studovány mezi jinými Felix aj.: Syntéza a biologická aktivita nových lineárních a cyklických analogů GRF v Peptides. Chemistry and Biology, Proc. 10th Am. Peptide Symposium, Ed. G.R. Marshall, ESCOM Sci. Publishers, Leiden, str. 465-467, (1988). Sdělili, že GRF analogy, substituované desNH₂-Tyr v poloze 1 a nebo D-Ala v poloze 2 mají zvýšenou stabilitu N koncových skupin vůči enzymatické degradaci. Tato informace byla nedávno potvrzena Frohmanem a j., Dipeptidylpeptidáza-IV a trypsinu podobná enzymatická degradace hormonu uvolňujícího lidský růstový hormon v plazmě. J. Clin. Invest. 83, 1533-1540

(1989). Mimo to posledně jmenovaná skupina ukázala, že N-acetylace a N-methylace N-koncové skupiny tyrosinu nebo substituce D-Tyr-1 v GRF úplně inhibují hydrolýzu v poloze 2-3. Na druhé straně, alfa methylace Tyr-1 pouze částečně bránila degradaci DPP-IV.

Murphy, W.A. a Coy D.H., Dlouhodobě účinné alkylované analogy faktoru uvolňujícího růstový hormon, Peptide Research 1, 36-41, (1988), popisují analogy GRF, které ukazují zvýšenou odolnost vůči enzymatické degradaci jako důsledek N-alkylace postranních skupin lysinů v peptidovém řetězci.

Řetězce přirozeného GRF mají v poloze 15 Gly zbytek. Je známo, že analogy s Ala nebo Leu v poloze 15 mají zvýšenou schopnost uvolňovat GH. Viz na příklad US patenty 4,649,131 a 4,734,399 jakož i Ling-N. aj. Quo-vadis Symposium, Sanofi Group, 29-30. květen 1985, Toulouse-Labege (str. 309-322). Substituce Gly-15 Val nebo alfa-aminoisomáselnou kyselinou rovněž zvyšovaly účinnost GRF analogů, Felix aj. Syntéza a biologická účinnost nových analogů faktoru uvolňujícího růstový hormon, v Peptides 1986, Walter de Gruyter and Co., Berlin-New York, str. 481-484 (1987).

A. M. Felix informoval o plánu syntetizovat analogy se zvýšenou anebo prodlouženou biologickou účinností zahrnující přípravu a testování Ala¹⁵H-GRF(1-29)NH₂ a desNH₂-Tyr¹, D-Ala², Ala¹⁵HGRF(1-29)NH₂. Viz na příklad US patenty 4,649,131 a 4,734,399 jakož i A.M. Felix, E.P. Heimer, T.F. Mowles, H. Bisenbeis, P. Leung, T.J. Lambros, M. Ahmad, C.T. Wang a Paul Brazeau: Syntéza a biologická účinnost nových analogů faktoru uvolňujícího růstový hormon, v Peptides 1986, Walter de Gruyter and Co., Berlin-New York, str.

481-484 (1987), Felix A.M., Wang C.T., Heimer E., Fournier A., Bolin D., Ahmad M., Lambros T., Mowles T. a Miller L.: Syntéza a biologická aktivita nových lineárních a cyklických analogů GRF v Peptides. Chemistry and Biology, Proc. 10th Am. Peptide Symposium, Ed. G.R. Marshall, ESCOM Sci. Publishers, Leiden, str. 465-467, (1988), D. Peticlerc, H. Lapierre, G. Pelletier, P. Dubreuil, P. Gaudreau, T. Mowles, A. Felix a P. Brazeau: Účinek aktivních analogů lidského faktoru uvolňujícího růstový hormon (hGRF) na uvolňování růstového hormonu (GH) a produkci mléka u dojných krav. Meeting Abstract P223, 82nd Meeting American Dairy Sci. Assn., Columbia, MO, 21-24 června 1987.

Analog GRF, modifikovaný Ser-2, jakož i dalších osm jiných modifikací téže molekuly, je popsán Touém aj.: Amfifilní analogy faktoru uvolňujícího růstový hormon (GRF): struktura peptidů a biologická aktivita in vivo. Biochem. Biophys. Res. Commun. 139, 763-770 (1986). Tento analog má 165% aktivitu in vivo u ovci ve srovnání s bGRF(1-44)NH₂.

US patent 4,734,399 popisuje GRF analogy, které mají Ala, N-methyl-D-Ala nebo D-Ala v poloze 2 a Ala, Leu, Val, Ile, Nle, Nval nebo beta-Ala v poloze 15. Viz též US patent 4,649,131.

Evropská patentová přihláška Coy a Murphy, číslo publikace 0 188 214, Application Number 86100127.9 popisuje analogy GRF s Leu nebo Phe v poloze 2 spolu s GRF peptidy, které jsou v poloze 2 substituované různými aminokyselinami přirozeně se nevyskytujícími s L nebo D-konfigurací.

Analogy GRF s velmi nízkou biologickou aktivitou, které mají Sar2 a Pro2 popisuje Coy aj.: Strategie návrhu synte-

tických analogů a antagonistů faktoru uvolňujícího růstový hormon, Peptides, Vol. 7, Suppl. 49-52 (1986).

Ling aj.: Analogy faktoru uvolňujícího růstový hormon se silnou antagonistickou aktivitou v Peptides, Chemistry and Biology, Proc. 10th Am. Peptide Symposium, Ed. G.R. Marshall, ESCOM Sci. Publishers, Leiden, str. 484-486, (1988) informovali o řadě analogů GRF substituovaných buď Arg nebo různými D-aminokyselinami v poloze 2. Všechny jsou méně účinné než základní hormon a některé z nich vykazovaly antagonistickou aktivitu.

Předchozí vynález představuje syntetické GRF polypeptidy, které mají zbytek Ser na místě aminokyselin normálně nalézáných v poloze 8 a 28 polypeptidu jako prostředek inhibující chemický rozklad (deaminaci) ve vodném prostředí. Viz US patentovou přihlášku pořadové číslo 07-303,518, podanou 27. ledna 1989, a pořadové číslo 07-323,955 z 15. března 1989. Rovněž A.R. Friedman, A.K. Ichhpurani, D.M. Brown, R.M. Hillman, L.F. Kravill, R.A. Martin, H.A. Zürcher-Neely a D.M. Guido: Degradace analogů faktoru uvolňujícího růstový hormon v neutrálním vodném roztoku se vysvětluje deaminací asparaginových zbytků. Náhrada asparaginových skupin serinem stabilizuje. Int. J. Peptide Protein Res. 37, 14-20 (1991).

Předchozí vynález popisuje syntetické GRF polypeptidy, které mají substituován zbytek cysteové kyseliny (Cys) místo aminokyseliny v poloze R_3 a nebo R_{25} . Viz US patentovou přihlášku pořadové číslo 07-150,301, podanou 29. ledna 1988, a pořadové číslo 89-00245 z 27. ledna 1989.

Analog hGRF s 29 aminokyselinami byl navržen G. Velicebim aj." Proc. Natl. Aca. Sci. USA, Vol. 83, 5397-5399 (1986).

Má prvních šest aminokyselin u aminového konce stejných a liší se od přirozeného peptidu 13 aminokyselinami ve zbytku řetězce včetně zahrnutí Ser skupiny v poloze 8. Amidová forma a forma volné kyseliny analogu mají vzorec: H-Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Ser-Ser-Ala-Tyr-Arg-Arg-Leu-Leu-Ala-Gln-Leu-Leu-Ala-Ser-Arg-Arg-Leu-Leu-Gln-Glu-Leu-Leu-Ala-Arg-NH₂/OH. Když byla ověřována jejich schopnost stimulovat uvolňování růstového hormonu GH v primárních kulturách buněk krysích předních hypofýz, amidový analog byl 1,57 krát silnější než hGRF(1-40)OH, zatím co volná kyselá forma měla jen 1/6 účinnosti ve stejném pokusu.

Vale aj. (US patentová přihláška pořadové číslo 053,233, podaná 22. května 1987 popisuje 31 zbytkové analogy hGRF, které využívají skupinu v poloze 31 s postranním funkcionalizovaným řetězcem, který může být spojen s zvláštním proteínem. Analogy hGRF s 31 skupinami mohou též mít substituce jiných skupin, které se objevují v přirozeném řetězci GRF, jako Asn nebo Ser v poloze 8, Phe v poloze 10 nebo Ala v poloze 15. Asn nebo Ser mohou být v poloze 28.

Je známo, že za určitých okolností jsou v přítomnosti vody deamidovány Asn skupiny polypeptidů. Avšak není jasné, co ovlivňuje rychlosti deamidace. Na příklad v polypeptidu trypsinu jsou deamidovány jen některé Asn skupiny s částečnou sekvencí Asn-Ser, zatím co jiné deamidovány nejsou. Viz Kossiakoff A.A.: Science 240, 191-194 (1988).

Evropská patentová přihláška číslo 86308337.4, číslo publikace O 220 958 popisuje třídu sloučenin, které mají vzorec H-X-Pro-Peptid, ve kterých X je zbytek přirozeně se vyskytující aminokyseliny, Pro znamená přirozeně se vyskytující

aminokyselinu prolin a Peptid je řetězec zbytků aminokyselin definovaný biologicky aktivním peptidem nebo proteinem. Příklady H-X-Pro-Peptidů zahrnují Met-Pro(faktor uvolňující růstový hormon), který může být chemicky převeden na GRF.

Analogy peptidů, které nejsou GRF a jsou rozšířeny na N konci, určené pro různé účely, byly též popsány. Na příklad: M.A. Tallon aj.: Biochem.26,7767-7774 (1987) připravili synteticky analogy alfa reprodukčního faktoru kvasinek rozšířené na N konci s Ala, Glu-Ala, Ala-Glu-Ala nebo Glu-Ala-Glu-Ala. Tyto peptidy jsou používány při studiu vztahů mezi strukturou a aktivitou.

D. Andreu aj.: 20th Eur. Peptide Symp. Tubingen, NSR, 4-9. září 1988, Symposium Abstracts, s.33 syntetizovali celou sekvenci 64 aminokyselin prekursorové formy analogu cecropinu A spolu s mnoha kratšími peptidy, odpovídajícími předpokládaným reakčním meziproductům. Mezi nimi byl úplný řetězec cecropinu rozšířený o Ala-Pro-Gly-Pro na N konci. Byl použit k důkazu, že se rozšiřující část opravdu štěpí čistěním enzymatickým preparátem podobným dipeptidylpeptidázou, získaným z kokonů bource cecropia. Viz též H. Boman a j.: J. Biol. Chem. 264, 5852-5860 (1989).

G. Kreil aj.: Eur. J. Biochem., 111, 49-58 (1980) informují, že melittin, hlavní složka včeliho jedu je odvozen z pro-melittinu. Řetězec pro-melittinu se skládá z šesti X-Pro a pěti X-Ala opakovaných dipeptidických skupin. Výsledky prezentované Kreilem aj. naznačují, že konverze prekursoru na produkt může probíhat postupným štěpením dipeptidových jednotek enzymem typu dipeptidylpeptidázy IV, přítomným v extraktech z jedových žláz.

C. Mollay aj. Eur. J. Biochem., 160, 31-35 (1986): Caerulein a xenopsin jsou dva peptidy nalezené v kožních sekretch *Xenopus laevis*. První má sekvenci Phe-Ala-Asp-Gly a druhý Ser-Ala-Glu-Ala na rozšíření N koncové skupiny jejich odpovídajících prekursorů. Dipeptidylpeptidáza typu IV, izolovaná z výměšků žabi kůže má specifitu vyžadovanou pro štěpení těchto rozšíření N konců, což vede ke konečným produktům.

D. Julius aj. Cell, 32, 839-852 (1983): *Sacharomyces cerevisiae* alfa buňky vylučují jako kopulační feromon alfa faktor peptid s 13 aminokyselinami. Nekopulující mutanti alfa buňek, kteří nemají dipeptidylpeptidázu vázanou na membrány, neprodukují normální alfa faktor, ale vylučují řadu nedokonalé připravených forem se strukturami Glu-Ala-Glu-Ala-alfa-faktor nebo Asp-Ala-Glu-Ala-alfa-faktor, které mají výrazně sníženou biologickou aktivitu. Ukázalo se, že dipeptidylpeptidáza vázaná na membrány je nezbytná pro normální zpracování prekursoru alfa faktoru a že tato reakce může omezovat rychlost zrání alfa faktoru v normálních alfa buňkách kvasinek.

C.L. Choy aj. Eur. J. Biochem., 160, 267-272 (1986): Prekursor proteinu zabráňující zmrznutí novofundlandského zimního platýze obsahuje čtyři opakované sekvence X-Pro a sedm X-Ala na koncové N skupině. Ačkoliv reakce prekursoru nebyly studovány, autoři uvažují, že k modifikaci prekursoru by mohlo docházet v plazmě účinkem enzymu podobného dipeptidylpeptidáze, který by postupně odbourával dipeptidové jednotky prodlužující části a uvolňoval protein zabráňující zmrznutí.

Až po prioritním datu základní patentové přihlášky Suhr aj. podali zprávu o izolaci a charakterizaci celé délky klonu cDNA kodujícího myši GRF. Předvidalo se, že zralý myši GRF je peptid s 42 aminokyselinovými skupinami a volným karboxylovým koncem. Tento peptid má valinovou skupinu v poloze 2. Ta jej odlišuje od GRF jiných druhů, které mají všechny Ala v poloze 2. Viz Mol. Endocrinology, 3, 1693-1700 (1989).

Na základě úvah jiných autorů byly připraveny analogy GRF se substitucí Leu¹⁹ /jmenovitě Thr² Ala¹⁵ Leu¹⁹Leu²⁷-bGRF-(1-29)NH₂, trifluoracetátová sůl, sloučenina číslo 3, Leu¹⁹Leu²⁷ bGRF(1-29)NH₂ trifluoracetát, Ala¹⁵ Leu¹⁹ Leu²⁷ bGRF(1-29)NH₂ trifluoracetát/. Při testování uvolňování růstového hormonu in vitro za použití buněk krysy přední hypofýzy byly Leu¹⁹ analogy /jmenovitě Thr² Ala¹⁵Leu¹⁹Leu²⁷-bGRF-(1-29)NH₂ trifluoracetát, sloučenina číslo 3, Leu¹⁹ Leu²⁷ bGRF(1-29)NH₂ trifluoracetát, Thr² Leu¹⁹ Leu²⁷bGRF(1-29)NH₂ i trifluoracetát Ala¹⁵ Leu¹⁹ Leu²⁷ bGRF(1-29)NH₂ trifluoracetát významně méně aktivní než odpovídající Ala¹⁹ analogy. Při zkoušení in vivo na rostoucích volech v dávce 10 pmol/kg nebylo množství GH uvolněné Leu¹⁹ analogy během 2 hodinového sledování významně odlišné (p menší než 0,05) od sloučenin s Ala¹⁹. Při sledování stability v hovězí plazmě byly sloučeniny s Leu¹⁹ stálejší než Ala¹⁹ analogy.

V molekule GRF je poloha 19 v oblasti, která je vřetenová v prostředí podobnému membráně: Clore G.M., Martin S.R. a Gronenborn A.H.: J.Mol. Biol. 191,553-561 (1986). Není známo, zda úloha Ala¹⁹ skupiny v molekulách GRF je strukturální nebo zda je to receptor dotykového zbytku. Sato K., Hotta M., Kagegama J., Chiang T.C., Hu H.Y., Dong M.H. a Ling N.:

Biochem. Biophys. Res. Commun. 149 (2) 531-537 (1987), Schiffer M. a Edmundson A.B.: Biophys. J. 7, 121 (1967). Substituce D-Ala¹⁹ za Ala¹⁹ v hGRF(1-29)NH₂ snížila standardní schopnost uvolňovat GH in vitro na 6% analogu s L-Ala¹⁹ při pokusu s buňkami krysi hypofýzy. Tatáž substituce v Nle²⁷rGRF(1-29)NH₂ snížila účinnost na 10% standardu v soustavě buněk hovězí hypofýzy a totožná substituce v Nle²⁷rGRF(1-29)NH₂ snížila účinnost na 30% standardu v soustavě buněk krysi hypofýzy: Rivier J.: Second International Symposium on Vasointestinal Peptide and Related Peptides, Cap d' Agde, Francie, 1985. Naopak analog GRF se Ser¹⁹ byl stejně účinný jako hGRF(1-40) v pokusu se standardním uvolňováním buňkami krysi hypofýzy: Velicebi G., Patthi S. a Kaiser T.E.: Struktura a biologická aktivita analogů faktoru uvolňujícího růstový hormon, které mají potencionální amfifilní vřetenové karboxylové konce. Proc. Natl. Aca. Sci. USA, Vol. 83, 5397-5399 (1986).

Getzoff uvedl, že v peptidovém modelu myohemerythrinu mohou Ala, Ile, Ser a Thr substituovat Val beze ztráty vázání protilátek, ale peptid substituovaný Leu má sníženou vazebnou schopnost. (Getzoff E.D., Gysin H.M., Rodda S.J., Alexander H., Tainer J.A. a Lerner R.A.: Mechanismus vázání protilátek k proteinu. Science, 235, 1191-1196 (1987).

WO 90/15821 (publikované 27 prosince 1990 tedy po datu priority předmětu této přihlášky) popisuje různé GRF peptidy, které mají Thr, Val nebo Ile skupiny místo zbytků aminokyselin normálně nalézáných v poloze 2, Ala v poloze 19 v kombinaci s jednou z následujících aminokyselin Ala, Val, Leu Ile nebo Gly v poloze 15. GRF peptid může mít při-

padně zbytek Ser na místě zbytku aminokyseliny, která normálně bývá v polohách 8 a 28 polypeptidu.

Mimo to mohou být případně GRF peptidy rozšířeny na N konci alkyly C_1-C_5 , benzylem, $H(Y-X)_n$ nebo $H(Y-X)_m-(Y^1-X^1)_p$ kde Y a Y^1 jsou stejné nebo různé přirozeně se vyskytující aminokyseliny, s výhodou Tyr nebo Asp, X a X^1 , stejné nebo různé, jsou vybrány z Thr, Ser nebo Ala, s výhodou Thr nebo Ser, n je 1-10, m je 1-5, p je 1-5.

E.P. Heilmer aj. (12th Am. Peptide Symposium, Cambridge, MA, 16-22. června 1991), abstrakt číslo 32 v symposiálním "Program and Abstract" oznámil, že Val^2 zvyšuje odolnost mGRF vůči štěpení dipeptidylpeptidázou IV. Byla zveřejněna řada analogů hGRF s modifikacemi v poloze 2, s důrazem na Val^2 . V sekci posterů byly též uvedeny GRF analogy s Gly^2 , Ile^2 a Leu^2 .

Podstata vynálezu

Předmětem tohoto vynálezu je polypeptid podněcující uvolňování růstového hormonu hypofýzou (GRF peptid), který má Val nebo Ile v poloze 19. GRF peptid dle vynálezu bude mít Gly, Thr, Val nebo Ile zbytek místo zbytku aminokyseliny, který se normálně nalézá v poloze 2 v kombinaci s jednou z následujících aminokyselin Ala, Val, Leu, Ile nebo Gly v poloze 15. Ve výhodném provedení GRF peptid může mít Ser zbytek místo zbytku aminokyseliny, který se normálně nachází v polohách 8 a 28 polypeptidu. Navíc mohou být GRF peptidy dle tohoto vynálezu rozšířeny na N konci alkylem C_1-C_5 , benzylem $(X-Y)(X^1-Y)_n$, kde n je 0 až 20, přednostně 0 až 10,

X je jakákoliv přirozeně se vyskytující aminokyselina, Y je alanin, serin, threonin nebo prolin a když $n=0$, potom Y je vybrán ze skupiny tvořené alaninem, serinem nebo threoninem, X^1 je každá přirozeně se vyskytující aminokyselina s výjimkou prolinu nebo hydroxyprolinu.

Peptidy podle předloženého vynálezu jsou účinné in vivo a jsou mnohem odolnější proti štěpení enzymy krevní plazmy než řetězce přírodních GRF. Navíc jsou sloučeniny substituované Ser^6 a Ser^{28} chráněny proti deamidaci ve vodném prostředí a jsou chemicky mnohem stálější.

Termin GRF peptid, tak jak je užíván v popisu a nárocích, znamená známý polypeptid, který má délku mezi 27 až 44 zbytků a který způsobuje uvolňování růstového hormonu hypofýzou. Příklady GRF peptidů jsou přirozené nebo syntetické polypeptidy popsané v US patentech 4,517,181, 4,518,586, 4,528,190, 4,563,352, 4,585,756, 4,595,676, 4,605,643, 4,610,976, 4,626,976, 4,628,043, 4,684,987, 4,843,064 a v US patentové přihlášce pořadové číslo 89/00245, podané 27. ledna 1989. Všechny jsou sem zahrnuty tímto odkazem. Felix A.M., Wang C.T., Heimer E., Fournier A., Bolin D., Ahmad M., Lambros T., Mowles T. a Miller L : Syntéza a biologická aktivita nových lineárních a cyklických analogů GRF v Peptides. Chemistry and Biology, Proc.10th Am. Peptide Symposium, Ed. G.R.Marshall, ESCOM Sci. Publishers, Leiden, str. 465-467, (1988). Tou J.S., Kaempfe L.A., Vineyard B.D., Buonomo F.C., Della-Fera M.A., Baile C.A.: Amfifilní analogy faktoru uvolňujícího růstový hormon (GRF): Struktura peptidů a biologická aktivita in vivo. Biochem. Biophys. Res. Commun. 139, 763-770 (1986). Termin GRF peptidy zahrnuje jejich

netoxické soli.

Nomenklatura používaná při definování GRF peptidů je podle knihy Schroder a Lubke: Peptides, Academic Press (1965), přičemž se v souladu s konvenční reprezentací aminoskupina při N konci objevuje vlevo a karboxylová skupina na C konci vpravo. Jestliže má zbytek aminokyseliny isomerní formy, je uváděna L-forma, pokud není výslovně uvedeno jinak. Tento vý-
nález uvádí analogy GRF peptidů, které mají následující
vzorce: $R-R_1-R_2-R_3-Ala-Ile-Phe-Thr-R-Ser-Tyr-Arg-R_{12}-R_{13}-$
 $Leu-R_{15}-Gln-Leu-R_{18}-R_{19}-Arg-R_{21}-R_{22}-Leu-Gln-R_{25}-Ile-R_{27}-$
 $R_{28}-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-R_{34}-R_{35}-Gln-Glu-R_{38}-R_{39}-R_{40}-Arg-R_{42}-$
 $Arg-Leu-Z$, kde

R je H, C_1-C_5 alkyl nebo benzyl, s výhodou H,

R_1 je Tyr nebo His, s výhodou Tyr,

R_2 je Gly, Thr, Val nebo Ile, s výhodou Val nebo Ile,

R_3 je Asp, Glu nebo Cys, s výhodou Asp,

R_8 je Asp nebo Ser, s výhodou Ser,

R_{12} je Lys, N-epsilon-alkyl- nebo N-epsilon-benzyl-Lys
nebo Arg, s výhodou Lys nebo N-epsilon-alkyl nebo N-epsilon-
benzyl-Lys v případě, že R je C_1-C_5 alkyl nebo benzyl,

R_{13} je Val nebo Ile, s výhodou Val,

R_{15} je Ala, Val, Leu, Ile nebo Gly, s výhodou Ala, Val,
Leu nebo Ile, nejlépe Ala,

R_{18} je Ser nebo Tyr, s výhodou Ser,

R_{19} je Val nebo Ile, s výhodou Val,

R_{21} je Lys, N-epsilon-alkyl- nebo N-epsilon-benzyl-Lys
nebo Arg, s výhodou Lys nebo N-epsilon-alkyl nebo N-epsilon-
benzyl-Lys, pokud je R C_1-C_5 alkyl nebo benzyl,

R_{22} je Ala nebo Leu, s výhodou Leu,

R₂₅ je Asp nebo Glu, s výhodou Asp,

R₂₇ je Met, Ile nebo Leu, s výhodou Leu,

R₂₈ je Asn nebo Ser, s výhodou Ser,

R₃₄ je Ser nebo Arg, s výhodou Arg,

R₃₅ je Asn nebo Ser, s výhodou ASn,

R₃₈ je Arg nebo Gln, s výhodou Gln,

R₃₉ je Gly nebo Arg, s výhodou Gly,

R₄₀ je Ala nebo Ser, s výhodou Ala,

R₄₂ je Ala, Val nebo Phe, s výhodou Val, a

Z znamená karboxylový konec zbytku aminokyseliny na C konci a je to skupina -COOR_a, -CR_aO, -CONHNHR_a, -CONR_aR_b nebo -CH₂OR_a s R_a a R_b, které jsou C₁-C₈ alkyly nebo vodík, nebo jejich biologicky aktivní fragment rozšířený od R na N-konci k jakémukoliv zbytku v kterékoliv poloze mezi 27 až 44 jako její C konec, případně jejich Hse(lakton), HseOH nebo HseNR_aR_b a jejich netoxické soli,

R_a je s výhodou vodík (H),

R_b je s výhodou ethyl.

Příklady C₁-C₈ alkylů jsou methyl, ethyl, propyl, butyl, pentyl, hexyl, oktyl a jejich isomerní formy. Zkratka iPr se vztahuje na isopropyl.

Zkratka Bzl se používá pro benzyl.

Některé z možných realizací vynálezu jsou GRF peptidy, ve kterých R₁₉ je Val nebo Ile včetně peptidů

Thr²Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷bGRF(1-29)NH₂

Thr²Ala¹⁵Ile¹⁹Leu²⁷bGRF(1-29)NH₂

Val²Ala¹⁵Ile¹⁹Leu²⁷bGRF(1-29)NH₂

Ile²Ala¹⁵Ile¹⁹Leu²⁷bGRF(1-29)NH₂

Val²Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷bGRF(1-29)NH₂

Ile²Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷bGRF(1-29)NH₂

Gly²Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷bGRF(1-29)NH₂

Gly²Ala¹⁵Ile¹⁹Leu²⁷bGRF(1-29)NH₂ s výhodou peptidy

Thr²Ser⁸Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³⁰bGRF(1-30)NH₂

Thr²Ser⁸Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³³bGRF(1-33)NH₂

Thr²Ser⁸Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³⁷bGRF(1-37)NH₂

Thr²Ser⁸Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse⁴⁴bGRF(1-44)NH₂

Thr²Ser⁸Ala¹⁵Ile¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³⁰bGRF(1-30)NH₂

Thr²Ser⁸Ala¹⁵Ile¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³³bGRF(1-33)NH₂

Thr²Ser⁸Ala¹⁵Ile¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³⁷bGRF(1-37)NH₂ nebo

Thr²Ser⁸Ala¹⁵Ile¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse⁴⁴bGRF(1-44)NH₂ ještě lépe

Ile²Ser⁸Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³⁰bGRF(1-30)NH₂

Thr²Ser⁸Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³⁰bGRF(1-30)NH₂Et

Ile²Ser⁸Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³³bGRF(1-33)NH₂

Ile²Ser⁸Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³³bGRF(1-33)NH₂Et

Thr²Ser⁸Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³³bGRF(1-33)NH₂Et

Ile²Ser⁸Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³⁷bGRF(1-37)NH₂

Ile²Ser⁸Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse⁴⁴bGRF(1-44)NH₂

Val²Ser⁸Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³⁰bGRF(1-30)NH₂

Val²Ser⁸Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³³bGRF(1-33)NH₂

Val²Ser⁸Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³⁷bGRF(1-37)NH₂

Val²Ser⁸Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse⁴⁴bGRF(1-44)NH₂

Ile²Ser⁸Ala¹⁵Ile¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³⁰bGRF(1-30)NH₂

Ile²Ser⁸Ala¹⁵Ile¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³³bGRF(1-33)NH₂

Ile²Ser⁸Ala¹⁵Ile¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³⁷bGRF(1-37)NH₂

Ile²Ser⁸Ala¹⁵Ile¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse⁴⁴bGRF(1-44)NH₂

Val²Ser⁸Ala¹⁵Ile¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³⁰bGRF(1-30)NH₂

Val²Ser⁸Ala¹⁵Ile¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³³bGRF(1-33)NH₂

Val²Ser⁸Ala¹⁵Ile¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³⁷bGRF(1-37)NH₂

Val²Ser⁸Ala¹⁵Ile¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse⁴⁴bGRF(1-44)NH₂

Val²Ser⁶Ala¹⁵Ile¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³⁷bGRF(1-37)NH-n-propyl nebo
jejich netoxické soli

Nejlépším GRF peptidem podle tohoto vynálezu je

Val²Ser⁸Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³⁰bGRF(1-30)NH₂.

Jinou možností realizace tohoto vynálezu jsou peptidy
rozšířené na N konci. Mezi nimi jsou na příklad

N-alfa(Tyr-Ala-Phe-Pro-Phe-Ala)Tyr¹Thr²Ser⁸Ala¹⁵Ile¹⁹Leu²⁷
Ser²⁸bGRF(1-29)NH₂

N-alfa(Leu-Pro-Gly-Pro-Tyr-Ala)Tyr¹Thr²Ser⁸Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷
Ser²⁸bGRF(1-29)NH₂

N-alfa-(Ala-Pro-Gly-Pro-Tyr-Ser)₂Tyr¹Val²Ser⁸Ala¹⁵Ile¹⁹
Leu²⁷Ser²⁸Hse³²bGRF(1-32)NH₂

N-alfa(Leu-Pro-Tyr-Ala-Tyr-Ala)Tyr¹Ile²Ser⁸Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷
Ser²⁸bGRF(1-29)NH₂

N-alfa(His-Ala-Tyr-Pro-Tyr-Ala)Tyr¹Ile²Ser⁸Ala¹⁵Ile¹⁹Leu²⁷
Ser²⁸bGRF(1-29)NH₂

N-alfa(Glu-Pro-Phe-Ala-Tyr-Pro-His-Ala)Tyr¹Ile²Ser⁸Ala¹⁵Val¹⁹
Leu²⁷Ser²⁸bGRF(1-29)NH₂

N-alfa(His-Pro-His-Pro-His-Ala-Tyr-Ala)Tyr¹Thr²Ser⁸Ala¹⁵Val¹⁹
Leu²⁷Ser²⁸bGRF(1-37)NH₂

N-alfa(Tyr-Ala-Gly-Pro-Leu-Pro-Phe-Ala)Tyr¹Ile²Ser⁸Ala¹⁵Val¹⁹
Leu²⁷Ser²⁸Hse³²bGRF(1-32)NH₂

N-alfa(Val-Pro-Arg-Pro-Phe-Pro-Tyr-Ala)Tyr¹Ile²Ser⁸Ala¹⁵Val¹⁹
Leu²⁷Ser²⁸Hse³³bGRF(1-33)NH₂

N-alfa(Arg-Pro-Tyr-Ala-Ile-Pro-Phe-Ala)Tyr¹Ile²Ser⁸Ala¹⁵Val¹⁹
Leu²⁷Ser²⁸Hse³⁰bGRF(1-30)NH₂

N-alfa(Tyr-Ala)₄Tyr¹Val²Ser⁸Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³⁴
bGRF(1-34)NHCH₃

N-alfa(Ile-Pro-Glu-Ala-Tyr-Ala)Tyr¹Ile²Ser⁶Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷
Ser²⁸bGRF(1-37)NH₂

Další realizací tohoto vynálezu jsou libovolné shora uvedené modifikace, ve kterých Asp v poloze 3 a nebo 25 je nahrazeno Cya, s výhodou v poloze 3.

Sloučeniny s Val¹⁹ a Ile¹⁹ podle tohoto vynálezu jsou stejně aktivní (a někdy i aktivnější) při uvolňování GH in vitro (buňky krysi hypofýzy) než jejich odpovídající protějšky s Ala¹⁹ (Tabulka I a Obrázek 1). Jsou však stálejší vůči proteolýze při inkubaci v hovězí plazmě. Důkazy o zvýšené metabolické stabilitě sloučenin dle tohoto vynálezu (ve srovnání s přirozeným GRF řetězcem představovaným Leu²⁷

bGRF(1-29)NH₂) jsou uvedeny v Tabulce II, kde jsou shrnuty údaje o stabilitě in vitro. Sloučeniny podle tohoto vynálezu jsou aktivnější in vivo v dávce 10 pmol/kg než Leu¹⁹ analogy, viz Obrázek 2 a zpravidla uvolňují více růstového hormonu se stabilnějším účinkem než Ala¹⁹ a Leu¹⁹ analogy při zkouškách na kastrováných býcích při dávce 30 pmol/kg (Tabulka III). Na obrázcích 1 a 2 (sloučeniny byly použity jako trifluoracetátové soli) T2 znamená Thr², A15 znamená Ala¹⁵, L27 znamená Leu²⁷, L19 znamená Leu¹⁹, V19 znamená Val¹⁹ a I119 znamená Ile¹⁹.

Zvýšená účinnost sloučenin podle tohoto vynálezu, u nichž je R Val nebo Ile je doložena v Tabulce III a na Obrázku 2.

Na příklad znalec pozná z relativní účinnosti in vivo (při dávce 10 pmol/kg, Obrázek 2), že Thr²Ser⁶Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷

Ser²⁸bGRF(1-29)NH₂ trifluoracetát a Thr²Ser⁶Ala¹⁵Ile¹⁹Leu²⁷

Ser²⁸bGRF(1-29)NH₂ trifluoracetát, stejně jako Val¹⁹ a Ile¹⁹ sloučeniny (v dávce 30 pmol/kg, Tabulka III) jsou bioaktiv-

nějši než přirozený GRF.

Pro účely komerční produkce se dává přednost karboxylovému konci tvořenému homoserinem, laktonem nebo amidem homoserinu, případně sekundárnímu či terciárnímu C_1-C_8 alkylamidu homoserinu (s výhodou C_1-C_4 -alkylamidu).

Syntetické analogy GRF peptidů se připraví vhodnou metodou, včetně metod popsanych v US patentu 4,529,595 (sloupec 2, řádek 35 až sloupec 5, řádek 64) a v US patentu 4,689,318 (sloupec 2, řádek 23 až sloupec 9, řádek 13), oba jsou sem zahrnuty tímto odkazem.

Postup A představuje jednu metodu pro přípravu analogů GRF peptidů podle tohoto vynálezu.

POSTUP A

Peptidy se syntetizují technikou pevné fáze v syntetizátoru peptidů Applied Biosystems 430A (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornie) pomocí syntetických cyklů dodaných touto firmou. Boc aminokyseliny a ostatní reagenty byly dodány Applied Biosystems a jinými komerčními dodavateli. Používal se sekvenční, dvojitý kopulační protokol na výchozí p-methylbenzhydrylamino pryskyřici pro syntézu C koncových amidů karboxylové kyseliny. Pro syntézu C koncových kyselin se užívala odpovídající PAM pryskyřice. asparagin, glutamin a arginin jsou spojovány pomocí předem připravených symetrických anhydridů Boc aminokyselin.

Používají se následující ochrany pobočného řetězce:

Arg, tosyl

Asp, benzyl

Cys, 4-methylbenzyl

Glu, benzyl

Ser, benzyl

Thr, benzyl

Tyr, 4-bromocarbobenzoxy

Lys, 4-chlorocarbobenzoxy.

Odstranění ochrany Boc se dosáhne trifluoroctovou kyselinou (TFA) v methylenchloridu. Pokud se mají získat Hse analogy, zabuduje se pomocí pevné fáze Met a potom se modifikuje bromkyanidem po štěpení HF dobře známými metodami. Štěpení bromkyanidem převádí Met na peptid s Hse laktonem na C konci. Ten lze převést na peptid s Hse amidem účinkem vhodného aminu v rozpouštědle, jako je methanol nebo dimethylformamid. Analogy s Hse laktonem, HseOH, HseNR_aR_b na C konci lze připravit metodami popsánymi Kempem aj. BIOTECHNOLOGY, Vol. 4, str. 565-568 (1986). Po skončení syntézy jsou peptidy zbaveny ochrany a odděleny od pryskyřice bezvodým fluorovodíkem obsahujícím 10% p-kresolu. Štěpení skupin chránících pobočné skupiny a peptidu od pryskyřice se provádí při 0°C nebo níže, s výhodou při -20°C po třicet minut s následujícími třiceti minutami při 0°C. Po odstranění HF se peptid s pryskyřicí promyje ethérem a peptid extrahuje ledovou kyselinou octovou a lyofilizuje se. Před čistěním se cystein obsažený v surových peptidech okysličuje na odpovídající kyselinu pomocí perkyseliny mravenčí při -10°C až 10°C, s výhodou při 0°C jak je popsáno v Steward aj. Solid Phase Peptide Synthesis, Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois, 1984, str. 113. Konverze na Hse laktony a Hse amidy na C konci byla popsána výše.

Čistění se provádí iontovou výměnnou chromatografií na kationaktivní koloně Synchrorep S-300 (SynChrom-Inc. Linden,

Indiana). Peptid se nanáší s použitím ústoje 20 milimolárního TRIS (pH 6.8) v 20% acetonitrilu a vymývá s použitím gradientu 0-0.3 molárního chloridu sodného v témže rozpouštědle. Sloučeniny se dále čistí a zbaví solí kapalnou chromatografií s reversní fází na koloně Vydac C-18 (Separations Group, Hesperia, Kalifornie) s použitím gradientů voda:acetonitril, obě fáze obsahující 0.1% TFA. Vhodné frakce se spojí a lyofilizují. Získá se žádaný GRF peptid ve formě trifluoracetátové soli. Trifluoracetát lze převést na jiné soli, pokud je to žádoucí, známými metodami iontové výměny.

Peptidy se hydrolyzují 24 hodin za vakua v parní fázi v přístroji Pico-Tag Work Station (Waters) s použitím stabilně vroucí HCl (Pierce) v přítomnosti fenolu jako čistící látky při 110°C. Hydrolyzáty se analyzují na přístroji Beckman Amino Acid Analyzer, Model 6300. Složení peptidů se vypočítá s použitím známé koncentrace norleucinu jako vnitřního standardu.

Hmotová spektra byla získána pomocí přístroje Applied Biosystems Time of Flight Mass Spectrometer.

Příklady

Příklad 1

Příprava Thr²Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷bGRF(1-29)NH₂ trifluoracetátu, sloučenina č.1.

Syntéza analogu GRF peptidu, který má vzorec:

H-Tyr-Thr-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Val-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Leu-Asn-Arg-NH₂ (jako trifluoracetát) se provádí postupně podle postupu A. Výsledky analýzy aminokyselin, teoretické hodnoty v zá-

vorkách: Asp 4.06(4), Thr1.57(2), Ser 1.64(2), Glu 2.10(2),
Ala 2.25(2), Val 2.00(2), Ile 1.68(2), Leu 5.15(5), Tyr
1.88(2), Phe 0.94(1), Lys 2.00(2), Arg 2.94(3).

Příklad 2

Příprava Thr²Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷bGRF(1-29)NH₂ trifluoracetátu,
sloučenina č.2

Syntéza analogu GRF peptidu, který má vzorec:

H-Tyr-Thr-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-
Ala-Gln-Leu-Ser-Ile-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Leu-Asn-Arg-
-NH₂ (jako trifluoracetát) se provádí postupně podle postupu
A. Výsledky analýzy aminokyselin, teoretické hodnoty v zá-
vorkách: Asp 4.09(4), Thr1.98(2), Ser 1.64(2), Glu 2.05(2),
Ala 2.25(2), Val 1.0(1), Ile 2.84(3), Leu 5.07(5), Tyr
1.87(2), Phe 0.94(2), Lys.1.97(2), Arg 2.94(3).

Příklad 3

Příprava Thr²Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷bGRF(1-29)NH₂ trifluoracetátu,
sloučenina č.3

Syntéza analogu GRF peptidu, který má vzorec:

H-Tyr-Thr-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-
Ala-Gln-Leu-Ser-Leu-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Leu-Asn-Arg-
-NH₂ (jako trifluoracetát) se provádí postupně podle postupu
A. Výsledky analýzy aminokyselin, teoretické hodnoty v zá-
vorkách: Asp 4.08(4), Thr1.87(2), Ser 1.72(2), Glu 2.07(2),
Ala 1.93(2), Val 1.04(1), Ile 1.88(2), Leu 6.11(6), Tyr
1.90(2), Phe 0.93(1), Lys 2.03(2), Arg 3.09(3).

Příklad 4

Příprava Val²Ala¹⁵Leu¹⁹Leu²⁷bGRF(1-29)NH₂ trifluoracetátu,
sloučenina č.4.

Syntéza analogu GRF peptidu, který má vzorec:

H-Tyr-Val-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Leu-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Leu-Asn-Arg-NH₂ (jako trifluoracetát) se provádí postupně podle postupu A. Hmotová spektrální analýza (metodou Cf252 desorpce plazmy) m/z pro(M+H)⁺: pozorováno 3454.6, teorie 3452.1. Výsledky analýzy aminokyselin, teoretické hodnoty v závorkách: Asp 4.01(4), Thr 0.93(1), Ser 1.68(2), Glu 2.03(2), Ala 2.00(2), Val 1.85(2), Ile 1.88(2), Leu 6.11(6), Tyr 1.94(2), Phe 0.94(1), Lys 1.97(2), Arg 3.11(3).

Příklad 5

Příprava Ile²Ala¹⁵Leu¹⁹Leu²⁷bGRF(1-29)NH₂ trifluoracetátu, sloučenina č.5.

Syntéza analogu GRF peptidu, který má vzorec:

H-Tyr-Ile-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Leu-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Leu-Asn-Arg-NH₂ (jako trifluoracetát) se provádí postupně podle postupu A. Hmotová spektrální analýza (metodou Cf252 desorpce plazmy) m/z pro(M+H)⁺: pozorováno 3468.6, teorie 3466.1. Výsledky analýzy aminokyselin, teoretické hodnoty v závorkách: Asp 4.02(4), Thr 0.94(1), Ser 1.67(2), Glu 2.05(2), Ala 2.00(2), Val 0.94(1), Ile 1.83(2), Leu 6.12(6), Tyr 1.94(2), Phe 0.95(1), Lys 1.99(2), Arg 3.13(3).

Příklad 6

Příprava Val²Ala¹⁵Ile¹⁹Leu²⁷bGRF(1-29)NH₂ trifluoracetátu, sloučenina č.6.

Syntéza analogu GRF peptidu, který má vzorec:

H-Tyr-Val-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ile-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Leu-Asn-Arg-NH₂ (jako trifluoracetát) se provádí postupně podle postupu

A. Hmotová spektrální analýza (metodou Cf252 desorpce plazmy) m/z pro $(M+H)^+$: pozorováno 3453.4, teorie 3452.1. Výsledky analýzy aminokyselin, teoretické hodnoty v závorkách: Asp 4.03(4), Thr 0.94(1), Ser 1.69(2), Glu 2.03(2), Ala 2.01(2), Val 1.89(2), Ile 2.85(3), Leu 5.11(5), Tyr 1.95(2), Phe 0.95(1), Lys 1.99(2), Arg 3.08(3).

Příklad 7

Příprava Ile²Ala¹⁵Ile¹⁹Leu²⁷bGRF(1-29)NH₂ trifluoracetátu, sloučenina č.7.

Syntéza analogu GRF peptidu, který má vzorec:

H-Tyr-Ile-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ile-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Leu-Asn-Arg-NH₂ (jako trifluoracetát) se provádí postupně podle postupu

A. Hmotová spektrální analýza (metodou Cf252 desorpce plazmy) m/z pro $(M+H)^+$: pozorováno 3469.7, teorie 3466.1. Výsledky analýzy aminokyselin, teoretické hodnoty v závorkách: Asp 4.03(4), Thr 0.94(1), Ser 1.69(2), Glu 2.06(2), Ala 2.04(2), Val 0.94(1), Ile 3.78(4), Leu 5.11(5), Tyr 1.94(2), Phe 0.95(1), Lys 1.98(2), Arg 3.09(3).

Příklad 8

Příprava Val²Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷bGRF(1-29)NH₂ trifluoracetátu, sloučenina č.8.

Syntéza analogu GRF peptidu, který má vzorec:

H-Tyr-Val-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Val-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Leu-Asn-Arg-NH₂ (jako trifluoracetát) se provádí postupně podle postupu

A. Hmotová spektrální analýza (metodou Cf252 desorpce plazmy) m/z pro $(M+H)^+$: pozorováno 3440.6, teorie 3438.1. Výsledky analýzy aminokyselin, teoretické hodnoty v závorkách: Asp

4.02(4), Thr 0.93(1), Ser 1.67(2), Glu 2.03(2), Ala 2.00(2), Val 2.78(3), Ile 1.86(2), Leu 5.09(5), Tyr 1.92(2), Phe 1.04(1), Lys 1.98(2), Arg 3.05(3).

Příklad 9

Příprava Ile²Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷bGRF(1-29)NH₂ trifluoracetátu, sloučenina č.9.

Syntéza analogu GRF peptidu, který má vzorec:

H-Tyr-Ile-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Val-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Leu-Asn-Arg-NH₂ (jako trifluoracetát) se provádí postupně podle postupu A. Hmotová spektrální analýza (metodou Cf252 desorpce plazmy) m/z pro(M+H)⁺: pozorováno 3454.9 teorie 3452.1. Výsledky analýzy aminokyselin, teoretické hodnoty v závorkách: Asp 4.02(4), Thr 0.93(1), Ser 1.69(2), Glu 2.04(2), Ala 2.06(2), Val 1.86(2), Ile 2.84(3), Leu 5.10(5), Tyr 1.94(2), Phe 0.94(1), Lys 1.98(2), Arg 3.07(3).

S použitím postupné syntézy podle postupu a lze rovněž připravit následující peptidy:

Ile²Ser⁸Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³⁰bGRF(1-30)NH₂

Ile²Ser⁸Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³³bGRF(1-33)NH₂

Ile²Ser⁸Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³⁷bGRF(1-37)NH₂

Ile²Ser⁸Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse⁴⁴bGRF(1-44)NH₂

Val²Ser⁸Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³⁰bGRF(1-30)NH₂

Val²Ser⁸Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³³bGRF(1-33)NH₂

Val²Ser⁸Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³⁷bGRF(1-37)NH₂

Val²Ser⁸Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse⁴⁴bGRF(1-44)NH₂

Ile²Ser⁸Ala¹⁵Ile¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³⁰bGRF(1-30)NH₂

Ile²Ser⁸Ala¹⁵Ile¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³³bGRF(1-33)NH₂

Ile²Ser⁸Ala¹⁵Ile¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³⁷bGRF(1-37)NH₂

Ile²Ser⁸Ala¹⁵Ile¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse⁴⁴bGRF(1-44)NH₂
 Val²Ser⁸Ala¹⁵Ile¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³⁰bGRF(1-30)NH₂
 Val²Ser⁸Ala¹⁵Ile¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³³bGRF(1-33)NH₂
 Val²Ser⁸Ala¹⁵Ile¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³⁷bGRF(1-37)NH₂
 Val²Ser⁸Ala¹⁵Ile¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse⁴⁴bGRF(1-44)NH₂
 Thr²Ser⁸Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³⁰bGRF(1-30)NH₂
 Thr²Ser⁸Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³³bGRF(1-33)NH₂
 Thr²Ser⁸Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³⁷bGRF(1-37)NH₂
 Thr²Ser⁸Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse⁴⁴bGRF(1-44)NH₂
 Thr²Ser⁸Ala¹⁵Ile¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³⁰bGRF(1-30)NH₂
 Thr²Ser⁸Ala¹⁵Ile¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³³bGRF(1-33)NH₂
 Thr²Ser⁸Ala¹⁵Ile¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³⁷bGRF(1-37)NH₂
 Thr²Ser⁸Ala¹⁵Ile¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse⁴⁴bGRF(1-44)NH₂
 Thr²Ser⁸Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³⁰bGRF(1-30)NH₂
 Thr²Ser⁸Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³³bGRF(1-33)NH₂
 Ile²Ser⁸Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³⁰bGRF(1-30)NH₂
 Ile²Ser⁸Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³³bGRF(1-33)NH₂
 Val²Ser⁸Ala¹⁵Ile¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³⁷bGRF(1-37)NH-n-propyl.

Postup B

Vedle přípravy GRF analogů technikou pevné fáze mohou být tyto analogy získány metodou rekombinantní DNA podle postupu popsaného pro Leu²⁷bGRF(1-44)OH (evropská patentová přihláška 0212531)s následujícími úpravami v segmentu DNA kodující v Leu²⁷bGRF(1-44)OH jsou kodony pro Ala², Asn⁸, Gly¹⁵ a Asn²⁸ nahrazeny kodony : na příklad (ACT) Thr² nebo (ATT) Ile² nebo (GTT) Val², (AGT) Ser⁸, (GCT) Ala¹⁵, (AGT) Ser²⁸.

Navíc pro GRF analogy obsahující Cys³ se kodon GAT (Asp³) nahradí kodonem TGT pro Cys³. Po vytvoření proteinu a reakci s bromkyanem v mravenčí kyselině, jak je popsáno ve

shora uvedené evropské patentové přihlášce se přidá k rozto-
ku peroxid vodíku asi při 0°C k oxidaci zbytku Cys na Cya.
Peptid se pak čistí popsánymi metodami.

Mimo to se pro analogy GRF rozšířené na N konci přidají
DNA segmenty, kodující rozšíření na N konci, takto: (TATACT)
pro Tyr-Thr, (TATACT)_n pro (Tyr-Thr)_n, (TATAGT)_n pro
(Tyr-Ser)_n nebo (TATAGTTATACT) pro Tyr-Ser-Tyr-Thr nebo
(TATACTTATAGT) pro Tyr-Thr-Tyr-Ser, (GATGCT) pro Asp-Ala
atd. Gen pro prekursorový protein se vloží do výrazového
vektoru E. Coli. Po vytvoření proteinu se provede izolace
z materiálu a rozklad bromkyanidem v mravenčí kyselině tak,
jak je popsáno v zmíněné evropské patentové přihlášce. Mra-
venčí kyselina se odstraní sníženým tlakem a surový polypep-
tid se pak čistí popsánymi metodami.

Sloučeniny podle tohoto vynálezu lze připravit známými
technikami rekombinantní DNA, protože tyto peptidy jsou
složeny pouze z přirozeně se vyskytujících aminokyselin. V
tom je rozdíl vůči známým analogům, které obsahují skupiny
nekodované DNA, jako jsou D-Ala a nebo desaminoTyr, a budou
vyžadovat pro jakoukoliv produkci ve velkém měřítku náklad-
nou chemickou syntézu nebo kombinaci genetického inženýrství
s chemickými postupy.

Rekombinantní výchozí mikroorganismy používané v tomto vý-
nálezu se připraví technikami rekombinantní DNA, které jsou
dobře známe odborníkům a jsou popsány na příklad v T. Mania-
tis: Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory
(1982) a v B. Perbal: A Practical Guide to Molecular
Cloning, John Wiley, New York. (1984). Tyto knihy jsou zahr-
nuty do popisu touto referencí.

Analogy s Hse laktonem, HseOH, HseNR_aR_b na C konci lze připravit metodami popsanými Kempem aj. BIOTECHNOLOGY, Vol 4, str. 565-568 (1986).

POSTUP C

Tento postup se týká GRF analogů podle tohoto vynálezu, alkylovaných na dusíku. Peptidy se připraví buď chemickou nebo biochemickou metodou (postup A nebo B). N-alkylace se pak dosáhne známými metodami, např. Murphy, W.A. a Coy D.H., Dlouhodobě účinné alkylované analogy faktoru uvolňujícího růstový hormon, Peptide Research 1, 36-41, (1988), V.Sythyamoorthy aj. Reduktivní methylace neurotoxinu botulínu Typů A a B, Mol. Cell. Biochem. 83, 65-72, (1988).

Postupem C lze též připravit následující peptidy:

N-epsilon-iPr-Tyr¹Thr²Ser⁸N-epsilon-iPrLys^{12,21}Val¹⁵Ile¹⁹

Leu²⁷Ser²⁸bGRF(1-29)NH₂

N-epsilon-iPr-Tyr¹Thr²Ser⁸N-epsilon-iPr-Lys^{12,21}Ala¹⁵Val¹⁹

Leu²⁷bGRF(1-40)NH₂

N-epsilon-Bzl-Tyr¹Thr²Ser⁸N-epsilon-Bzl-Lys^{12,21}Val¹⁵Ile¹⁹

Ile²⁷Ser²⁸bGRF(1-32)NH₂

N-epsilon-iPr-Tyr¹Ile²Ser⁸N-epsilon-iPr-Lys^{12,21}Ala¹⁵Val¹⁹

Leu²⁷Ser²⁸bGRF(1-40)NH₂

N-epsilon-Bzl-Tyr¹Val²Ser⁸N-epsilon-Bzl-Lys^{12,21}Val¹⁵Val¹⁹

Ile²⁷Ser²⁸bGRF(1-32)NH₂

Všechny syntetické GRF peptidy podle tohoto vynálezu, včetně peptidů připravených v příkladech se považují za biologicky aktivní a užitečné pro stimulaci uvolňování GH hypofýzou.

Dávky mezi asi 10 nanogramy a asi 5 mikrogramy těchto peptidů na kilogram tělesné hmotnosti se považují za zvláště

účinné pro vyvolání sekrece GH. Stimulace vylučování GH těmito peptidy by měla vést k odpovídajícímu zvýšení růstu u lidí, skotu a jiných zvířat s normálními hladinami GH. Mimo to by podávání mělo změnit obsah tuku v těle a upravit jiné metabolické, imunologické a vývojové procesy, které závisí na GH. Na příklad mohou být tyto analogy užitečné jako prostředky stimulující anabolické procesy u člověka ve stavech podobných následkům popálení. V jiném příkladě mohou být tyto analogy podávány komerčním teplokrevným zvířatům, jako kuřatům, krůtám, prasatům, kozám, skotu a ovčím, a mohou být používány v rybářství pro chov ryb a jiných chladnokrevných mořských živočichů, např. mořských želv a úhořů, a obojživelníků k urychlení růstu a zvýšení poměru proteinů k tuku, získaného podáváním účinných dávek peptidů. Tyto analogy se mohou používat ke stimulaci imunitních funkcí u lidí a zvířat pro léčení cukrovky vznikající z abnormální produkce růstového hormonu, či pro zlepšení hojení kostí, ran a spálenin, nebo při osteoporóze. Také lze použít tyto analogy pro povzbuzení růstu vlasů.

Denní dávky mezi 10 nanogramy/kg a asi 50 mikrogramy/kg tělesné hmotnosti se považují za zvláště účinné pro zvýšení laktace, růstu a stimulaci imunitních funkcí.

Pro podávání lidem a zvířatům by tyto syntetické peptidy měly mít čistotu alespoň asi 93% a s výhodou alespoň 98%.

Tyto syntetické peptidy nebo jejich netoxické soli, kombinované s farmakologicky nebo veterinárně přijatelným nosičem do formy farmaceutického přípravku, s výhodou pro prodloužené uvolňování, se podávají zvířatům a lidem buď intravenózně, podkožně, přes kůži nebo nosní sliznicí. Lékař

je může použít pro stimulaci uvolňování GH, pokud léčený pacient takovou terapii potřebuje. Vhodné dávkování bude záviset na zdravotním stavu a délce požadované léčby.

Takové peptidy se často podávají ve formě nejedovatých solí, jako jsou kyselé adiční soli nebo kovové komplexy, třeba se zinkem, železem a podobně, (pro potřeby aplikace jsou považovány za soli). Jako adiční soli lze jmenovat hydrochlorid, hydrobromid, síran, maleát, octan, citran, benzoan, jantaran, jablečnan, askorbát, vinan atd. V případě, že aktivní složka se má podat v isotonickém roztoku, soli mohou ovlivnit fosfátové a jiné ústoje.

Peptidy by se měly podávat lidem za dohledu lékaře a farmaceutické přípravky budou obvykle obsahovat peptid spolu s konvenčním, pevným či kapalným farmaceuticky přijatelným nosičem. Základní dávka obvykle bude od asi 100 nanogramů do asi 50 mikrogramů peptidu na kilogram tělesné hmotnosti pacienta.

Ačkoliv vynález byl popsán s ohledem na formy, kterým se dává přednost, budiž rozuměno, že lze uskutečnit různé změny a úpravy, které jsou zřejmé osobám zběhlým v oboru, aniž by se vybočilo z rozsahu jeho nároků. Na příklad lze provést modifikaci peptidového řetězce vynecháním jednoho nebo dvou zbytků od C konce peptidu podle současně známé experimentální praxe, což vede k peptidům, které si zachovávají značnou část své biologické účinnosti. Proto takové peptidy spadají do rozsahu tohoto vynálezu. Mimo to lze substituovat C konec a nebo N konec peptidu, a nebo lze přirozeně se vyskytující zbytky substituovat za jejich obecné ekvivalenty, jak je všeobecně známo v peptidové chemii. Tak lze na příklad

vyrobit jiné analogy se zvýšenou odolností vůči proteolýze a při tom mající alespoň podstatnou část účinnosti polypeptidů dle nároku, aniž by se dostaly z rozsahu vynálezu, ilustrovaného sloučeninami 1 až 15. Rovněž známé substituce karboxylové skupiny na C konci, např. nižší alky-lamidy, vedou k ekvivalentním molekulám.

Způsoby, které byly popsány shora lze vyrobit GRF peptidy obecného vzorce

$R^1-R_1-R^1_2-R_3$ -Ala-Ile-Phe-Thr- R_8 -Ser-Tyr-Arg- R^1_{12} - R_{13} -Leu-
 R_{15} -Gln-Leu- R_{18} - R_{19} -Arg- R^1_{21} - R_{22} -Leu-Gln- R_{25} -Ile- R_{27} - R_{28} -
Arg-Gln-Gln-Gly-Glu- R_{34} - R_{35} -Gln-Glu- R_{38} - R_{39} - R_{40} -Arg- R_{42} -
Arg-Leu-Z, kde

R^1 je $(X-Y)-(X^1-Y)_n$ s n 0-20, s výhodou 0-10 a X je přirozeně se vyskytující aminokyselina, Y je alanin, serin, threonin nebo prolin a v případě, že $n=0$, pak je Y vybrán ze skupiny tvořené alaninem, serinem nebo threoninem, X^1 je kterákoliv přirozeně se vyskytující aminokyselina s výjimkou prolinu nebo hydroxyprolinu

R_1 je Tyr nebo His,

R_2 je Gly, Thr, Val nebo Ile,

R_3 je Asp, Glu nebo Cya,

R_8 je Asn nebo Ser,

R_{12} je Lys, nebo Arg,

R_{13} je Val nebo Ile,

R_{15} je Ala, Val, Leu, Ile nebo Gly,

R_{18} je Ser nebo Tyr,

R_{19} je Val nebo Ile,

R_{21} je Lys, nebo Arg,

R_{22} je Ala nebo Leu,

R_{25} je Asp, Glu nebo Cya,

R_{27} je Met, Ile nebo Leu,

R_{28} je Asn nebo Ser,

R_{34} je Ser nebo Arg,

R_{35} je Asn nebo Ser,

R_{38} je Arg nebo Gln,

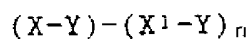
R_{39} je Gly nebo Arg,

R_{40} je Ala nebo Ser,

R_{42} je Ala, Val nebo Phe,

Z znamená karboxylový konec zbytku aminokyseliny na C konci a je to skupina $-COOR_a$, $-CR_aO$, $-CONHNHR_a$, $-CONR_aR_b$ nebo $-CH_2OR_a$ s R_a a R_b , které jsou C_1-C_8 alkyly nebo vodík, nebo jejich biologicky aktivní fragment rozšířený od R na N-konci ke kterémukoliv zbytku v kterékoliv poloze mezi 27 až 44 jako její C konec, případně jejich Hse(lakton), HseOH nebo HseNR_aR_b a jejich netoxické soli. Tyto modifikace lze připravit podle současně známých experimentálních postupů. Protože si zachovávají podstatnou část biologické aktivity původního peptidu, jsou tyto modifikace považovány za součást vynálezu.

Rozšiřující část GRF peptidu podle tohoto vynálezu má řetězec aminokyselin odpovídající vzorci



n zde představuje počet lineárně spojených X-Y skupin, toto číslo je od 0 do 20, s výhodou od 0 do 10 skupin.

X je vybrána ze skupiny tvořené všemi přirozeně se vyskytujícími aminokyselinami,

Y je vybrána ze skupiny tvořené prolinem, alaninem, serinem a threoninem, pouze v případě, že $n=0$, pak je Y vybrána

ze skupiny tvořené alaninem, serinem nebo threoninem,

X^1 je vybrána ze skupiny tvořené kteroukoliv přirozeně se vyskytující aminokyselinou s výjimkou prolinu nebo hydroxyprolinu.

Podle tohoto vzorce v případě, že $n=1$, jsou zde dvě skupiny Y. Dále je možné mít až dvacetjednu Y skupinu a dvacet X^1 skupin v jednom provedení. Jednotlivé zbytky Y a X^1 mohou být libovolné aminokyseliny z příslušné skupiny, ze které mají být vybrány. To znamená, že jednotlivé zbytky Y nemusí být stejné v daném provedení. Podobně i v provedení vynálezu s více než jednou X^1 skupinou každá jednotlivá X^1 skupina může být kterákoliv aminokyselina s výjimkou prolinu a hydroxyprolinu, bez ohledu na charakter jiných zbytků X^1 . Všechny jednotlivé Y a X^1 zbytky musí odpovídat pravidlům pro danou specifickou skupinu a stačí, aby různé jednotlivé zbytky v určených polohách odpovídaly pravidlům stanoveným shora.

Tabulka I

Účinek analogů bGRF na vylučování in vitro krysího GH z kultur buněk krysí přední hypofýzy*

Sloučenina číslo.....	Název (jako trifluoracetát)	Koncentrace analogu nM			
		0.01	0.1	1	10
	bez dávkování GRF	1963 ^a	1963 ^a	1963 ^a	1963 ^a
	Leu ²⁷ bGRF(1-29)NH ₂	3474 ^{c,d}	7561 ^d	15172 ^e	16506 ^c
9	Ile ² Ala ¹⁵ Val ¹⁹ Leu ²⁷ bGRF(1-29)NH ₂	5598 ^g	12082 ^g	17230 ^f	
7	Ile ² Ala ¹⁵ Ile ¹⁹ Leu ²⁷ bGRF(1-29)NH ₂	5162 ^{f,g}	11006 ^{f,g}	16980 ^f	
8	Val ² Ala ¹⁵ Val ¹⁹ Leu ²⁷ bGRF(1-29)NH ₂	4629 ^{e,f}	11832 ^{f,g}	16578 ^g	
6	Val ² Ala ¹⁵ Ile ¹⁹ Leu ²⁷ bGRF(1-29)NH ₂	4141 ^{d,e}	10686 ^f	16370 ^{e,f}	
1	Thr ² Ala ¹⁵ Val ¹⁹ Leu ²⁷ bGRF(1-29)NH ₂	3852 ^d	9252 ^e	16138 ^{e,f}	
2	Thr ² Ala ¹⁵ Val ¹⁹ Leu ²⁷ bGRF(1-29)NH ₂	2541 ^{a,b}	6263 ^{c,d}	13122 ^d	
	Thr ² Ala ¹⁵ Leu ²⁷ bGRF(1-29)NH ₂	2833 ^{b,c}	5831 ^c	13378 ^d	
5	Ile ² Ala ¹⁵ Leu ¹⁹ Leu ²⁷ bGRF(1-29)NH ₂		5835 ^c	12298 ^d	17272 ^d
4	Val ² Ala ¹⁵ Leu ¹⁹ Leu ²⁷ bGRF(1-29)NH ₂		3976 ^b	9540 ^c	16455 ^c
3	Thr ² Ala ¹⁵ Leu ¹⁹ Leu ²⁷ bGRF(1-29)NH ₂		2443 ^a	4483 ^b	13012 ^b

* Množství rGH vyloučeného z kultur buněk hypofýzy se měřilo radioimuno-
testem a je vyjádřeno v ng na vzorek za 4 hodiny. Podmínky testu jsou pop-
sány v Frohman, aj. Methods Enzymol. 124, 371 (1986).

a, b, c, d, e, f, g v daném sloupci jsou výsledky odlišné proti jiným indexům na
hladině významnosti pod 0.05.

Poznámka: Substituce Leu¹⁹ měla zhoršující účinek na schopnost uvolňovat
GH, zatím co Val¹⁹ a Ile¹⁹ modifikace vedly k analogům se sníženou účinnos-
tí. Leu²⁷bGRF(1-29)NH₂ se používal jako zkušební standard.

Tabulka II

Stabilita GRF peptidů substituovaných v poloze 19 v plasmě in vitro

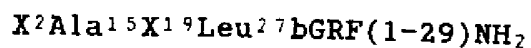
Sloučenina číslo	Jméno (jako trifluoracetát)	t _{1/2} (hod)
	Leu ²⁷ bGRF(1-29)NH	0.6 ^a
1	Thr ² Ala ¹⁵ Val ¹⁹ Leu ²⁷ bGRF(1-29)NH ₂	4.9 ^c
2	Thr ² Ala ¹⁵ Val ¹⁹ Leu ²⁷ bGRF(1-29)NH ₂	14.7 ^a
	Thr ² Ala ¹⁵ Val ¹⁹ Leu ²⁷ bGRF(1-29)NH ₂	6.6 ^b
3	Thr ² Ala ¹⁵ Leu ¹⁹ Leu ²⁷ bGRF(1-29)NH ₂	12.3 ^a

* Průměrná hodnota tří nezávislých pokusů (každý se dělal třikrát)

a, b, c Sloučeniny s různými indexy se liší na hladině meší než 0.05.

Tabulka III

Odezva sérového GH Holsteinských kastrátů na injekce GRF analogů s různými substitucemi v polohách 2 a 19 schematu



Řádka číslo	Sloučenina číslo	Jméno** (jako trifluoracetát)	Podíl v %	Maximum (ng/ml)
1	-	Voda	0 ^a	11.7 ^a
2	A	bGRF(1-44)NH ₂	83 ^b	73.2 ^a
3	B	Thr ² Ala ¹⁵ Leu ²⁷ bGRF(1-29)NH ₂	100 ^b	75.7 ^a
4	3	Thr ² Ala ¹⁵ Leu ¹⁹ Leu ²⁷ bGRF(1-29)NH ₂	100 ^b	83.5 ^a
5	4	Val ² Ala ¹⁵ Leu ¹⁹ Leu ²⁷ bGRF(1-29)NH ₂	92 ^b	70.9 ^a
6	5	Ile ² Ala ¹⁵ Leu ¹⁹ Leu ²⁷ bGRF(1-29)NH ₂	92 ^b	42.8 ^a
7	1	Thr ² Ala ¹⁵ Val ¹⁹ Leu ²⁷ bGRF(1-29)NH ₂	92 ^b	79.6 ^a
8	8	Val ² Ala ¹⁵ Val ¹⁹ Leu ²⁷ bGRF(1-29)NH ₂	100 ^b	69.4 ^a
9	9	Ile ² Ala ¹⁵ Val ¹⁹ Leu ²⁷ bGRF(1-29)NH ₂	92 ^b	72.7 ^a
10	2	Thr ² Ala ¹⁵ Ile ¹⁹ Leu ²⁷ bGRF(1-29)NH ₂	92 ^b	60.7 ^a
11	6	Val ² Ala ¹⁵ Ile ¹⁹ Leu ²⁷ bGRF(1-29)NH ₂	92 ^b	78.7 ^a
12	7	Ile ² Ala ¹⁵ Ile ¹⁹ Leu ²⁷ bGRF(1-29)NH ₂	100 ^b	49.5 ^a
13		SEM	5	12.7 ^f
14		P hodnota	0.0001	0.75

* Prezentovaná data zahrnují pouze zvířata, která reagovala na injekce GRF

** GRF analogy byly podávány ve formě intravenosních injekcí 30 pmol GRF/kg 2hodiny před krmením.

*** Heterogenita variace (Hartleyův test F-max), hodnota P a její index jsou počítány z logaritmické transformace dat.

^a ^b ^c ^d ^e Hodnoty s různými indexy ve sloupci jsou významně rozdílné (P menší než 0.05).

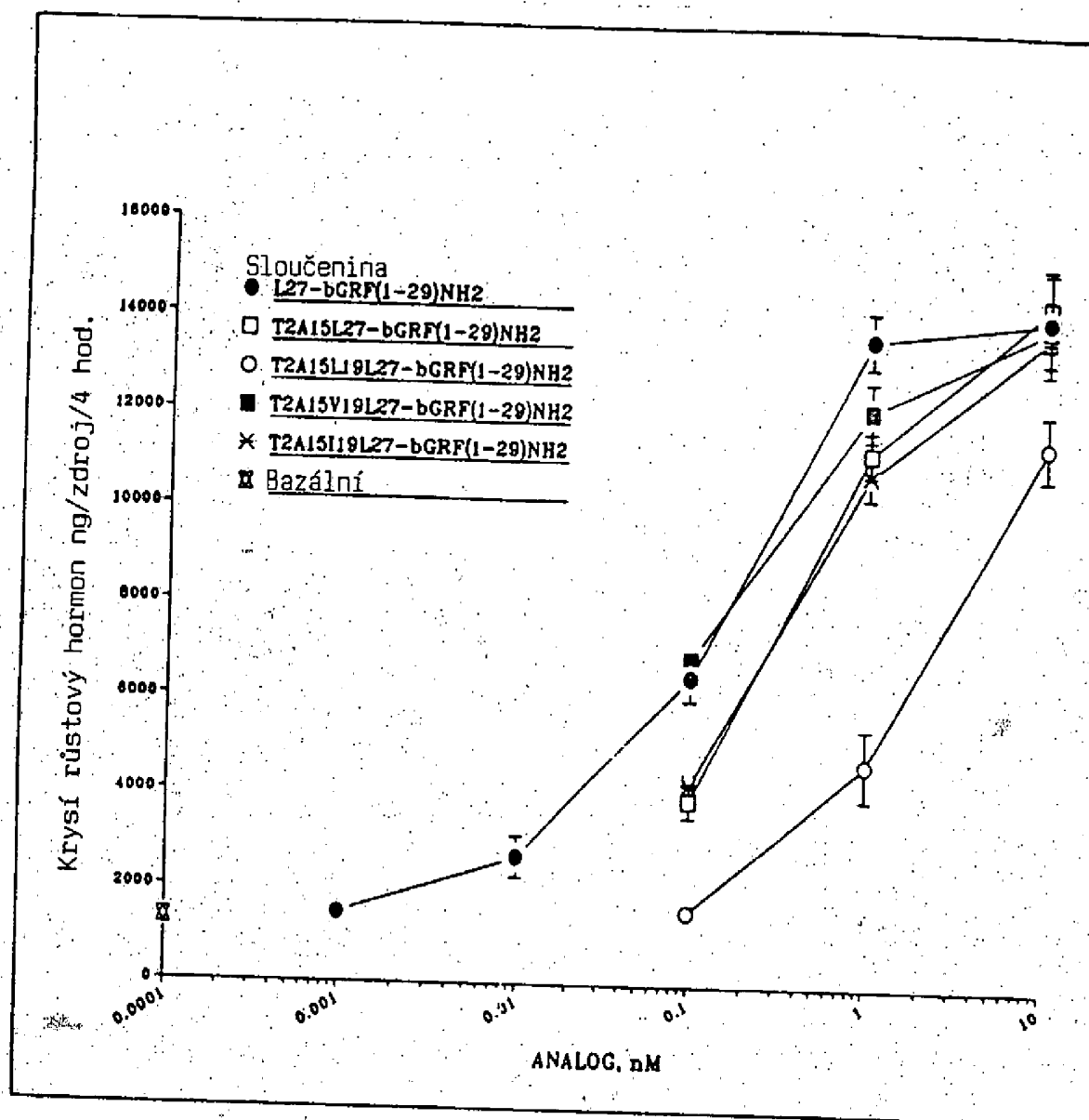
^f SEM při podávání GRF bylo 12.7 ng/ml, zatím co SEM u kontrol

Řádka číslo	Doba do max. minut	Plocha (jednotek)			Jako %A	Jako %B
		0-1h	1-2h	0-2h		
1	22 ^{abc}	0.51 ^a	0.50 ^a	1 ^a	44	28
2	12 ^a	0.73 ^b	0.56 ^a	2.29 ^b	100	64
3	18 ^{abc}	2.56 ^c	1.04 ^{bcd}	3.60 ^c	157	100
4	17 ^{abc}	2.43 ^{bc}	0.77 ^{ab}	3.20 ^{bc}	140	89
5	21 ^{bc}	2.16 ^{bc}	0.91 ^{abc}	3.07 ^{bc}	134	85
6	15 ^{abc}	1.43 ^b	0.95 ^{ab}	2.38 ^b	104	66
7	19 ^{abc}	2.75	1.35 ^{cde}	4.10 ^c	179	114
8	15 ^{ab}	2.30 ^{bc}	1.48 ^{bcd}	3.77 ^{bc}	165	105
9	22 ^{bc}	2.28 ^{bc}	1.96 ^e	4.25 ^c	186	118
10	22 ^{bc}	2.04 ^{bc}	1.19 ^{bcd}	3.23 ^c	141	90
11	20 ^{abc}	2.63 ^{bc}	1.74 ^{de}	4.37 ^c	191	121
12	24 ^c	1.56 ^{bc}	1.36 ^{cde}	2.91 ^{bc}	127	81
13	4 ^g	0.33	0.23	0.48		
14	0.32	0.0001	0.0001	0.0001		

s vodou bylo 45.2 ng/kg

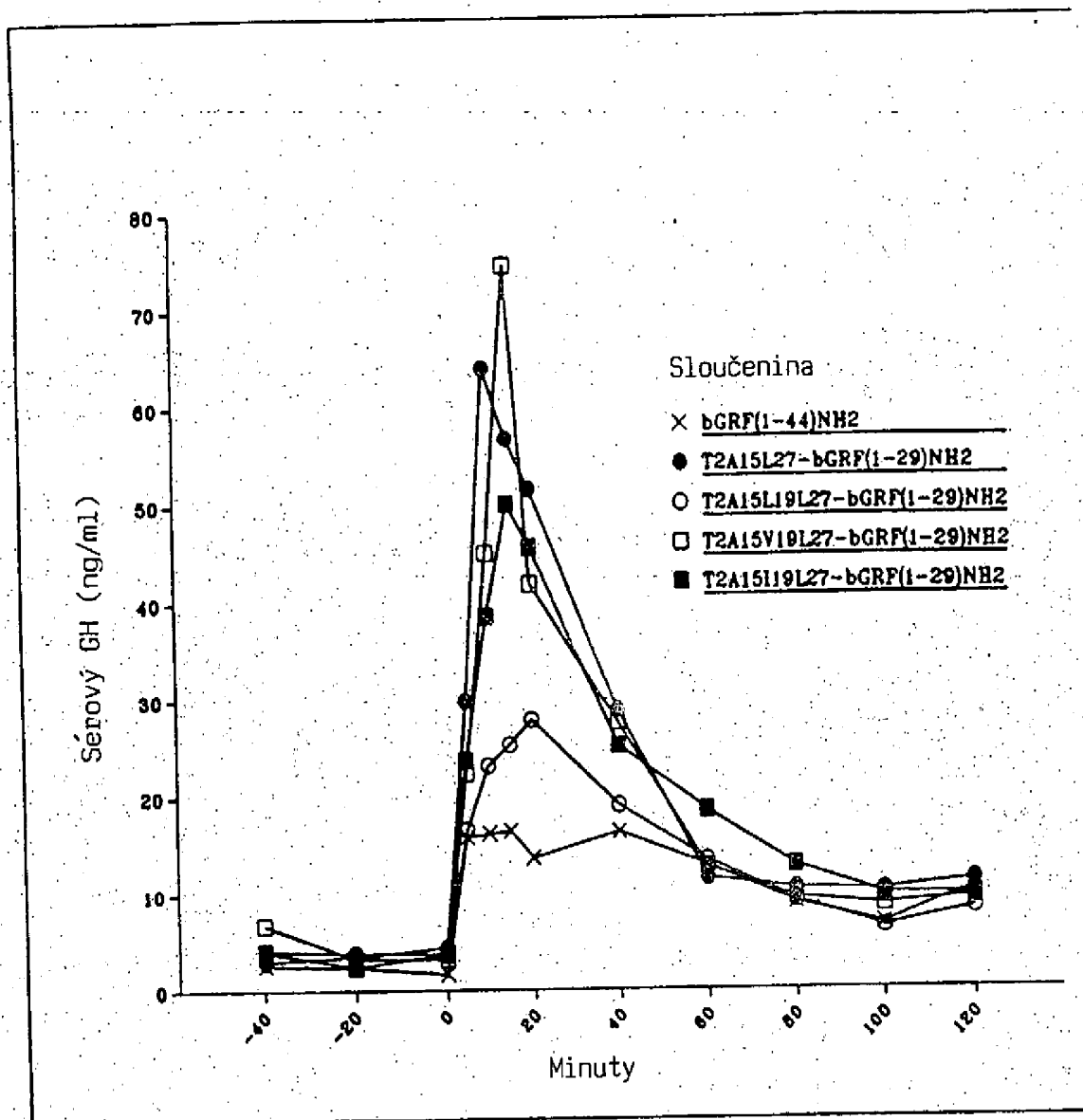
s SEM při podávání GRF bylo 4 minuty, zatím co SEM u kontrol

s vodou bylo 14 minut.



Obrázek 1

Účinek analogů $\text{Thr}^2\text{Ala}^{15}\text{Leu}^{27}\text{bGRF}(1-29)\text{NH}_2$ na uvolňování růstového hormonu GH v kulturách buněk krysi hypofýzy in vitro. Pokus se prováděl podle postupu Frohmana a Downse, Methods Enzymol. 124, 371-389 (1986). Leu^{19} substituce měla zhoubný účinek na schopnost analogů GRF uvolňovat GH, zatím co Val^{19} a Ile^{19} modifikace vedly k analogům s buď zvýšenou nebo nezměněnou bioaktivitou in vitro ve srovnání s $\text{Thr}^2\text{Ala}^{15}\text{Leu}^{27}\text{bGRF}(1-29)\text{NH}_2$. $\text{Leu}^{27}\text{bGRF}(1-29)\text{NH}_2$ sloužil jako pokusný standard.



Obrázek 2

Průměrné koncentrace sérového růstového hormonu GH u Holsteinských kastrátů krmených otrubami po intravenosní injekci 10 pmol/kg GRF analogů. Pokus se prováděl podle popisu Moseley aj., J. Endocrinol. 117, 252-259 (1988). Hovězí GRF(1-44)NH₂ se používal jako pokusný standard.

PŘÍL. PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ	URAD	10. V. 93	028537	č.j.
			DOŠLO	

PATENTOVÉ NÁROKY

1. GRF peptid s Val nebo Ile v místo zbytku aminokyseliny, která se normálně nalézá v poloze 19, Gly, Thr, Val nebo Ile zbytek místo zbytku aminokyseliny, který se normálně nalézá v poloze 2, a s jednou aminokyselinou ze skupiny aminokyselin Ala, Val, Leu, Ile nebo Gly v poloze 15.

2. GRF peptid podle nároku 1, vyznačený tím, že aminokyselina v poloze 2 je Thr, Val nebo Ile.

3. GRF peptid podle nároku 1 obecného vzorce

R-R₁-R₂-R₃-Ala-Ile-Phe-Thr-R₈-Ser-Tyr-Arg-R₁₁₂-R₁₁₃-Leu-R₁₅-Gln-Leu-R₁₈-R₁₉-Arg-R₂₁-R₂₂-Leu-Gln-R₂₅-Ile-R₂₇-R₂₈-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-R₃₄-R₃₅-Gln-Glu-R₃₈-R₃₉-R₄₀-Arg-R₄₂-Arg-Leu-Z, kde

R je H, C₁-C₅ alkyl nebo benzyl,

R₁ je Tyr nebo His,

R₂ je Gly, Thr, Val nebo Ile,

R₃ je Asp, Glu nebo Cya,

R₈ je Asn nebo Ser,

R₁₂ je Lys, nebo Arg, nebo N-epsilon-alkyl nebo N-epsilon-benzyl-Lys v případě, že R je C₁-C₅ alkyl nebo benzyl,

R₁₃ je Val nebo Ile,

R₁₅ je Ala, Val, Leu, Ile nebo Gly,

R₁₈ je Ser nebo Tyr,

R₁₉ je Val nebo Ile,

R₂₁ je Lys, nebo Arg, nebo N-epsilon-alkyl nebo N-epsilon-

lon-benzyl-Lys v případě, že R je C₁-C₅ alkyl nebo benzyl,

R₂₂ je Ala nebo Leu,

R₂₅ je Asp, Glu,

R₂₇ je Met, Ile nebo Leu,

R₂₈ je Asn nebo Ser,

R₃₄ je Ser nebo Arg,

R₃₅ je Asn nebo Ser,

R₃₈ je Arg nebo Gln,

R₃₉ je Gly nebo Arg,

R₄₀ je Ala nebo Ser,

R₄₂ je Ala, Val nebo Phe, a

Z znamená karboxylovou část zbytku aminokyseliny na C konci a je to skupina -COOR_a, -CR_aO, -CONHNHR_a, -CONR_aR_b nebo -CH₂OR_a s R_a a R_b, které jsou C₁-C₈ alkyl nebo vodík, nebo jejich biologicky aktivní fragment rozšířený od R na N-konci ke zbytku v kterékoliv poloze mezi 27 až 44 jako její C konec, případně jejich Hse(lakton), HseOH nebo HseN-R_aR_b, a jejich netoxické soli.

4. GRF peptid podle nároku 3, vyznačený tím, že R₂ je Thr, Val nebo Ile.

5. GRF peptid podle nároku 5, vybraný ze skupiny tvořené

Thr²Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷bGRF(1-29)NH₂

Thr²Ala¹⁵Ile¹⁹Leu²⁷bGRF(1-29)NH₂

Val²Ala¹⁵Ile¹⁹Leu²⁷bGRF(1-29)NH₂

Ile²Ala¹⁵Ile¹⁹Leu²⁷bGRF(1-29)NH₂

Val²Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷bGRF(1-29)NH₂

Ile²Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷bGRF(1-29)NH₂

Thr²Ser⁸Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³⁰bGRF(1-30)NH₂

Thr²Ser⁸Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³⁰bGRF(1-30)NH₂

Thr²Ser⁸Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³³bGRF(1-33)NH₂
Thr²Ser⁸Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³³bGRF(1-33)NH₂t
Thr²Ser⁸Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³⁷bGRF(1-37)NH₂
Thr²Ser⁸Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse⁴⁴bGRF(1-44)NH₂
Thr²Ser⁸Ala¹⁵Ile¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³⁰bGRF(1-30)NH₂
Thr²Ser⁸Ala¹⁵Ile¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³³bGRF(1-33)NH₂
Thr²Ser⁸Ala¹⁵Ile¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³⁷bGRF(1-37)NH₂
Thr²Ser⁸Ala¹⁵Ile¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse⁴⁴bGRF(1-44)NH₂
Ile²Ser⁸Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³⁰bGRF(1-30)NH₂
Ile²Ser⁸Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³⁰bGRF(1-30)NH₂t
Ile²Ser⁸Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³³bGRF(1-33)NH₂
Ile²Ser⁸Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³³bGRF(1-33)NH₂t
Ile²Ser⁸Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³⁷bGRF(1-37)NH₂
Ile²Ser⁸Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse⁴⁴bGRF(1-44)NH₂
Val²Ser⁸Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³⁰bGRF(1-30)NH₂
Val²Ser⁸Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³³bGRF(1-33)NH₂
Val²Ser⁸Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³⁷bGRF(1-37)NH₂
Val²Ser⁸Ala¹⁵Val¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse⁴⁴bGRF(1-44)NH₂
Ile²Ser⁸Ala¹⁵Ile¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³⁰bGRF(1-30)NH₂
Ile²Ser⁸Ala¹⁵Ile¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³³bGRF(1-33)NH₂
Ile²Ser⁸Ala¹⁵Ile¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³⁷bGRF(1-37)NH₂
Ile²Ser⁸Ala¹⁵Ile¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse⁴⁴bGRF(1-44)NH₂
Val²Ser⁸Ala¹⁵Ile¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³⁰bGRF(1-30)NH₂
Val²Ser⁸Ala¹⁵Ile¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³³bGRF(1-33)NH₂
Val²Ser⁸Ala¹⁵Ile¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³⁷bGRF(1-37)NH₂
Val²Ser⁸Ala¹⁵Ile¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse³⁷bGRF(1-37)NH₂nPr
Val²Ser⁸Ala¹⁵Ile¹⁹Leu²⁷Ser²⁸Hse⁴⁴bGRF(1-44)NH₂

nebo jejich netoxické soli

6. GRF peptid podle nároku 3, vyznačený tím, že R₁₅ je Ala,