

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 930261 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 930261

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C07K 7/06

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date 23.07.1991

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 22.01.1993

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 22.01.1993

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 13.06.2019

(86) Kansainvälinen hakemus - 23.07.1991 PCT/US1991/005208
Internationell ansökan - International
application

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

24.07.1990 US 557226 24.07.1990 US 558120

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Polygen Holding Corporation, 1201 North Market Street,, Wilmington Del. 19899, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Bowers, Cyril Y., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 •Hubbs, John C., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

3 •Foster, Charles H., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

4 •Cody, Wayne L., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

5 •Momany, Frank A., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Polypeptidihdisteitä, joilla on kasvuhormonia vapauttava vaikutus

Polypeptidföreningar som har växthormon frigörande verkan

Polypeptidiyhdisteitä, joilla on kasvuhormonia vapauttava vaikutus

5 Tämä keksintö koskee uusia polypeptidiyhdisteitä, jotka edistävät kasvuhormonin vapautumista, kun ne annetaan eläimille. Toisessa näkökohdassa tämä keksintö koskee menetelmiä, joilla edistetään kasvuhormonitasojen vapautumista ja kohoamista eläimissä, antamalla niille tiettyjä kasvuhormonia vapauttavia polypeptidiyhdisteitä.

10 Keksinnön tausta

Kasvuhormoni (KH) -tasojen kohoaminen nisäkkäissä kasvuhormonia vapauttavien yhdisteiden annon jälkeen voi johtaa suurentuneeseen ruumiinpainoon ja parantaa maidontuotantoa, mikäli annon jälkeen ilmenee riittävästi kohonneita kasvuhormonitasoja. Edelleen tiedetään, että kasvuhormonitasojen kohoaminen voidaan saada aikaan nisäkkäissä siten, että käytetään tunnettuja kasvuhormonia vapauttavia aineita, kuten luonnollisesti ilmeneviä kasvuhormonia vapauttavia hormoneja.

20 Kasvuhormonitasojen kohoaminen nisäkkäissä voidaan saada aikaan myös siten, että käytetään kasvuhormonia vapauttavia peptidejä, joista muutamia on aikaisemmin kuvattu, esimerkiksi US-patenteissa 4 223 019, 4 223 020, 4 223 021, 4 224 316, 4 226 857, 4 228 155, 4 228 156, 25 4 228 157, 4 228 158, 4 410 512, 4 410 513, 4 411 890 ja 4 839 344.

Endogeenisen kasvuhormonin vapautumisen estäjän, somatostatiinin (SRIF), vasta-aineita on myös käytetty saamaan aikaan kasvuhormonitasojen kohoamista. Tässä viimeisessä esimerkissä kasvuhormonitasoja kohotetaan siten, 30 että endogeeninen kasvuhormonin vapautumisen estäjä (SRIF) poistetaan, ennenkuin se pääsee aivolisäkkeeseen, jossa se estää kasvuhormonin vapautumisen.

35 Kuhunkin näihin menetelmiin, joilla edistetään kasvuhormonitasojen kohoamista, liittyy aineita, jotka ovat

kalliita syntetisoida ja/tai eristää riittävän puhtaina kohde-eläimelle antamista varten. Lyhytketjuiset, suhteellisen yksinkertaiset polypeptidit, joilla on kyky edistää kasvuhormonin vapautumista, olisivat toivottavia, koska

5 niitä voitaisiin helposti ja edullisesti valmistaa, niitä voitaisiin helposti muunnella kemiallisesti ja/tai fysikaalisesti, kuin myös niitä olisi helppo puhdistaa ja formuloida; ja niillä olisi erinomaiset kuljetusominaisuudet.

Olisi toivottavaa, että olisi lyhytketjuisia polypeptidejä, jotka edistäisivät kasvuhormonitasojen vapautumista ja kohoamista eläinten veressä. Myös se olisi käyttökelpoista, että tällaisia polypeptidejä voitaisiin käyttää edistämään kasvuhormonitasojen vapautumista ja kohoamista eläinten veressä.

15 Yhteenveto keksinnöstä

Olemme nyt löytäneet uusia polypeptidiyhdisteitä, jotka edistävät kasvuhormonin vapautumista eläimissä. Näiden polypeptidien kaava on $A_1-A_2-A_3-Trp-A_5-A_6-Z$, jossa A_1 on His, 3(NMe)His, A_0 -His, A_0 -3(NMe)His, Ala, Tyr tai His-Ala,

20 jossa A_0 on mikä tahansa luonnollisesti esiintyvä L-aminohappo, Met(O), DOPA, Abu tai kaavan $L-A_0$ mukaisia peptidejä, jossa L on H, DOPA, Lys, Phe, Tyr, Cys, Tyr-DAla-Phe-Gly, Tyr-DAla-Gly-Phe, Tyr-Ala-Gly-Thr tai Tyr-DAla-Phe-Sar, Edullisesti A_0 on jokin luonnollisesti esiintyvä aminohappo, edullisemmin A_0 on Ala, Lys tai Glu; A_2 on D^8 Nal tai DPhe; A_3 on Ala, Gly tai Ser; A_4 on DPhe, D/L^8 (Me)Phe tai (NMe)DPhe; A_6 on B-G tai G, jossa B on mikä tahansa luonnollisesti esiintyvä aminohappo, minkä tahansa luonnollisesti esiintyvien aminohappojen dipeptidejä tai $H_2N-(CH_2)_n-CO_2H$ (jossa $n = 2 - 12$) ja G on Arg, iLys tai Orn; Z on pääteryhmä $-CONR^1R^2$, $-COOR^1$ tai $-COOR^2$ (jossa R^1 on H, alkyyli-ryhmä, jossa on 1- noin 6 hiiliatomia, sykloalkyyli-ryhmä, jossa on 3 - noin 8 hiiliatomia, alkenyyli-ryhmä, jossa on 2 - noin 8 hiiliatomia, tai aryyli-ryhmä, jossa on

35 6 - noin 12 hiiliatomia, ja R^2 määritetään kuten R^1 ja ne

voivat olla samoja tai erilaisia), -Gly-Z', -Met-Z', -Lys-Z', -Cys-Z', -Gly-Tyr-Z' tai -Ala-Tyr-Z', jossa Z' on -CO-NR¹R², -COOR¹ tai -CH₂OR¹ (jossa R¹ ja R² ovat kuten edellä määritettiin), sekä niiden orgaanisia tai epäorgaanisia

5 farmaseuttisesti hyväksyttäviä suoloja.

Peptidin kaava on edullisesti

His-A₂-Ala-Trp-DPhe-Lys-NH₂,

A₀-His-A₂-Ala-Trp-DPhe-Lys-NH₂ (esimerkiksi

Ala-His-A₂-Ala-Trp-DPhe-Lys-NH₂) tai

10 Ala-A₂-Ala-Trp-DPhe-Lys-NH₂. Vielä edullisemmin A₂ on D^δNal. Tällaisia peptidejä voidaan käyttää edistämään veren kasvuhormonitasojen vapautumista ja kohoamista eläimissä, edullisesti ihmisissä, antamalla vaikuttava määrä peptidiä.

15 **Yksityiskohtainen kuvaus keksinnöstä**

Keksintö perustuu sellaisten useiden lyhyiden polypeptidiketjujen löytämiseen, jotka edistävät kasvuhormonitasojen vapautumista ja kohoamista. Esillä olevan keksinnön suojapiiriin kuuluvat polypeptidit määritetään seuraavalla yleisellä rakenteella:

20

A₁-A₂-A₃-Trp-A₅-A₆-Z, jossa A₁, A₂, A₃, A₅, A₆ ja Z ovat kuten alla määritetään. A₁ on His, 3(NMe)His (se on sellainen, jossa imidatsolirengas on metyloitu 3-asemasta), His-Ala, A₀-His, Ala, Tyr tai A₀-3(NMe)His, jossa A₀ on luonnollisesti esiintyvä L-aminohappo, Met(O), DOPA, Abu tai kaavan L-A₀ mukaisia peptidejä, jossa L on H, DOPA, Lys, Phe, Tyr, Cys, Tyr-DAla-Phe-Gly, Tyr-DAla-Gly-Phe, Tyr-Ala-Gly-Thr tai Tyr-DAla-Phe-Sar. A₁ on edullisesti His. Ala, His-Ala, A₀-His- tai Ala. A₁ on edullisemmin His tai A₀-His. A₀ on edullisesti luonnollisesti esiintyvä L-aminohappo, edullisemmin A₀ on Ala, Lys tai Glu. Vielä edullisemmin A₀ on Ala.

25

30

A₂ on D^δNal tai DPhe. A₂ on edullisesti D^δNal.

A₃ on Ala, Gly tai Ser. A₃ on edullisesti Ala.

A_5 on DPhe D/L⁶(Me)Phe tai (NMe)DPhe. Edullisesti A_5 on DPhe.

A_6 on B-G tai G, jossa B on mikä tahansa luonnollisesti esiintyvä aminohappo, jonkin luonnollisesti esiintyvien aminohappojen dipeptidejä (kuten Ala-Lys, Ala-Ala, Ala-Leu) tai $N_2N(CH_2)_nCO_2H$, jossa $n = 2 - 12$ ja G on Arg, iLys, Lys tai Orn. Edullisemmin B on mikä tahansa luonnollisesti esiintyvä L-aminohappo tai $H_2N(CH_2)_nCO_2H$, jossa $n = 4 - 8$. Vielä edullisemmin A_6 on G, Ala-Lys tai Ala-Ala-Lys. Jopa vielä edullisemmin A_6 on G.

Edullisimmin A_6 on Lys.

Z kuvaa polypeptidin C-pääteryhmää tai C-pääteaminohappoa (-happoja) plus loppuryhmää, jossa Z on $CONR^1R^2$, $-COOR^1$ tai $-CH_2OR^1$, jossa R^1 on H, alkyyliryhmä, jossa on 1 - noin 6 hiiliatomia, sykloalkyyliryhmä, jossa on 3 - noin 8 hiiliatomia, alkenyyliryhmä, jossa on 2 - noin 8 hiiliatomia, tai aryyliiryhmä, jossa on 6 - noin 12 hiiliatomia. R^2 määritetään kuten R^1 , ja ne voivat olla samoja tai erilaisia. R^1 on edullisesti H tai alkyyliryhmä, jossa on 1 - noin 6 hiiliatomia. Z voi olla myös -Gly-Z', -Met-Z', -Lys-Z', -Gys-Z', -Gly-Tyr-Z' tai -Ala-Tyr-Z', jossa Z' on kuten edellä määritettiin. Z on edullisesti $-CONR^1E^2$, $-COOR^1R^2$ tai $-CH_2OR^1$.

Sekä mainittujen polypeptidien farmaseuttisesti hyväksyttäviin orgaanisiin ja epäorgaanisiin additiosuoloihin.

Käytetyt aminohappotähteiden lyhenteet on standardin peptidinimistön mukaisia:

Gly = glysiini
 Tyr = L-tyroosiini
 Ile = L-isoleusiini
 Glu = L-glutamiinihappo
 Thr = L-treoniini
 Phe = L-fenyylialaniini
 Ala = L-alaniini

	Lys = L-lyysiini
	Asp = L-asparagiinihappo
	Cys = L-kysteiini
	Arg = L-arginiini
5	Gln = glutamiini
	Pro = L-proliini
	Leu = L-leusiini
	Met = L-metioniini
	Ser = L-seriini
10	Asn = L-asparagiini
	his = L-histidiini
	Trp = L-tryptofaani
	Val = L-valiini
	DOPA = 3,4-dihydroksifenyylialaniini
15	Met(O) = metioniinisulfoksidi
	Abu = α -aminovoihappo
	iLys = N ^ε -isopropyyli-L-lyysiini
	4-Abu = 4-aminovoihappo
	Orn = L-ornitiini
20	D ^α Nal = α -naftyyli-D-alaniini
	D ^β Nal = β -naftyyli-D-alaniini
	Sar = sarkosiini

Kaikki kolmikirjaimitset aminohappolyhenteet, jotka alkavat "D":llä, tarkoittavat aminohappotähteen D-konfiguraatiota, ja "D/L":llä alkavat lyhenteet tarkoittavat annettujen aminohappojen D- ja L-konfiguraatioiden seosta. Tässä glysiinin katsotaan kuuluvan termiin "luonnollisesti esiintyvät L-aminohapot".

Emäksisten, neutraaleiden tai happamien aminohappotähteiden, joita voidaan käyttää aminohappoina A₁, A₃, A₅ ja A₆, avulla saadaan peptidi, jossa halutun peptidin fysiokemialliset ominaisuudet on säädelty suurelta osin. Tällaisen joustavuuden avulla saadaan merkittäviä etuja halutun peptidin formulointiin ja sen antamiseen mille tahansa annetulle lajille. Lisää joustavuutta saadaan R- ja Z-osi-

en valinnalla, kuin myös tällöin voidaan halutun yhdisteen fysiokemiallisia ominaisuuksia säätää paremmin.

Edullisia kasvuhormonia vapauttavia yhdisteitä, joita on käytetty esillä olevan keksinnön käytäntöön sovelluksessa, ovat:

5

A_1-A_2 -Ala-Trp-DPhe- A_6 -Z, kuten

A_0 -His- A_2 -Ala-Trp-DPhe- A_6 -Z,

His-Ala- A_2 -Ala-Trp-DPhe- A_6 -Z,

Ala- A_2 -Ala-Trp-DPhe- A_6 -Z ja

10

His- A_2 -Ala-Trp-DPhe- A_6 -Z, sekä

näiden orgaaniset ja epäorgaaniset additiosuolat. A_2 on edullisesti D^8 Nal. Vieläkin edullisempia ovat

A_0 -His- D^8 Nal-ala-Trp-DPhe-Lys-NH₂ (erityisesti

Ala-His- D^8 Nal-Ala-Trp-DPhe-Lys-NH₂) sekä

15

kaikkien mainittujen polypeptidien orgaaniset ja epäorgaaniset additiosuolat.

Näitä yhdisteitä on tavallisesti helppo syntetisoida, ne vaikuttavat seerumin kasvuhormonitasoja kohottaen ja ne ovat edullisia kaupallisen mittakaavan tuotantoon ja hyväksikäyttöön. Lisäksi nämä yhdisteet voivat olla edullisia siinä mielessä, että niillä on fysiokemiallisia ominaisuuksia, jotka ovat toivottavia tällaisten polypeptidien jakamiseksi tehokkaasti monille erilaisille eläinlajeille, ja tämä johtuu niiden joustavuudesta, jonka on mahdollistanut erilaiset substituutiot polypeptidiyhdisteiden tiettyihin asemiin, valitsemalla näiden polypeptidiyhdisteiden N-pääte-, -C-pääte- ja keskusasemien polaarinen, neutraali tai ei-polaarinen luonne siten, että se sopii yhteen halutun antotavan kanssa.

20

30

Nämä peptidit ovat tavallisesti voimakkaampia edistämään seerumin kasvuhormonitasojen kohoamista kuin useimmat vastaavat peptidit, joissa on erilainen aminohappotähde A_2 -asemassa. D^8 Nal-peptidit ovat tavallisesti edullisimpia, koska ne ovat hyvin voimakkaita.

35

His- D^8 Nal-Ala-Trp-DPhe-Lys-NH₂- ja

A_0 -His- D^8 Nal-Ala-Trp-DPhe-Lys-NH₂-peptidit (kuten Ala-his- D^8 Nal-Ala-Trp-DPhe-Lys-NH₂),

A_0 -His-DPhe-Ala-Trp-DPhe-Lys-NH₂-peptidit, kuten Ala-His-DPhe-Ala-Trp-DPhe-Lys-NH₂ ja niiden orgaaniset ja epäorgaaniset additiosuolat ovat edullisimpia.

Näiden yhdisteiden on todettu olevan erittäin voimakkaita edistämään seerumin kasvuhormonitasojen kohoamista.

Tämän keksinnön yhdisteitä voidaan käyttää parantamaan veren kasvuhormonitasoja eläimissä; parantamaan maidontuotantoa lehmissä; parantamaan ruumiin kasvua ihmisissä, kuten nisäkkäissä (esim. ihmiset, lampaat, naudat ja siat), kuin myös kaloissa, siipikarjassa, muissa selkärangaisissa ja äyriäisissä; ja lisäämään villan ja/tai turkiksen tuotantoa nisäkkäissä. Ruumiin kasvu riippuu eläinlajien sukupuolesta ja iästä, annettavan kasvuhormonia vapauttavan yhdisteen määrästä ja identtisyydestä, antotavasta ja vastaavista tekijöistä.

Tämän keksinnön uusia polypeptidiyhdisteitä voidaan syntetisoida liuos- ja kiinteä-faasi-peptidikemian tavanno-
maisilla menetelmillä tai kemiassa tunnetuilla klassisilla menetelmillä. Kiinteä-faasi-synteesi aloitetaan peptidin C-pääteryhmän päästä. Sopiva lähtöaine voidaan valmistaa esimerkiksi kiinnittämällä tarvittava suojattu alfa-aminohappo kloorimetyloituun hartsiin, hydroksimetyylihartsiin, bentshydryyliamiini- (BHA) hartsiin tai parametyyli-bentsyylihydryyliamiini- (p-Me-BHA) hartsiin. Erästä tällaista kloorimetyylihartsia myy kauppanimellä BIOBEADS SX-1 Bio Rad Laboratories, Richmond, Kalifornia.

Hydroksimetyylihartsin valmistuksen kuvaavat Bodansky et al., Chem. Ind. (Lontoo) 38, 1597 (1966). BHA-hartsin ovat kuvanneet Pietta ja Marshall, Chem. Comm., 650 (1970) ja sitä myy Peninsula Laboratories, Inc., Belmont, Kalifornia.

Ensimmäisen kiinnityksen jälkeen alfa-aminoryhmän suojaryhmä voidaan poistaa valituilla happamilla reagensseilla, kuten trifluorietikkahappo- (TFA) tai suolahappo- (HCl) liuoksilla orgaanisissa liuottimissa huoneenlämpötilassa. Kun alfa-aminoryhmän suojaryhmä on poistettu, jäljelle jääneet suojatut aminohapot voidaan liittää vaiheittain halutussa järjestyksessä. Kukin suojattu aminohappo voidaan tavallisesti saattaa reagoimaan noin kolminkertaisena ylimääränä, käyttäen sopivaa karboksyyli ryhmän aktivaattoria, kuten disykloheksyylikarbodi-imidi (DCO tai di-isopropyylikarbodi-imidi (DIC) liuoksessa, esimerkiksi metyleenikloridissa (CH_2Cl_2) tai dimetyyliformamidissa (DMF) ja näiden seoksissa.

Kun haluttu aminohappojärjestys on saatu, haluttu peptidi voidaan lohkaista hartsirungosta käsittelemällä reagenssilla, kuten vetyfluoridilla (HF), joka ei ainoastaan lohkaise peptidiä hartsista vaan lohkaisee myös yleisesti käytetyt sivuketjun suojaryhmät. Kun käytetään kloorimetyylihartsia, HF-käsittelyssä muodostuu vapaa peptidihappo. Käytettäessä BHA- tai p-Me-BHA-hartsia, HF-käsittely johtaa suoraan vapaisiin peptidiamideihin.

Edellä kuvattu kiinteä-faasi-menetelmä on hyvin tunnettu, ja sen ovat kuvanneet Stewart ja Young, Solid Phase Peptide Synthesis: toinen painos (Pierce Chemical Co., Rockford, IL 1984).

Joitakin liuosmenetelmiä, joita voidaan käyttää syntetisoitaessa esillä olevan keksinnön mukaisia peptidiosia, esitetään teoksessa Bodansky et al., Peptide Synthesis, 2. painos, John Wiley & Sons, New York, N.Y. 1976.

Uskotaan, että peptidejä syntetisoidaan edullisemmin liuosfaasimenetelmällä, johon liittyy vähintään kahden peptidifragmentin kondensaatioreaktio.

Tässä menetelmässä kondensoidaan peptidifragmentti $\text{X-A}_1\text{-Y}$ peptidifragmentin U-V-W kanssa, jossa kaikki aminohapposivuketjut A_1 :tä lukuunottamatta ovat neutraaleja tai

suojattuja, ja jossa X on Prot. tai Prot.-A₀, jossa Prot. on N-pääterryhmän suojaryhmä; Y on A₂-Q, Ala-A₂-Q, A₂-A₃-Q, Ala-A₂-A₃-A₄-Q, Ala-A₂-A₃-A₄-Q, Ala-Q tai -Q, jossa, kun Y on Q, U on J-A₂-A₃-A₄ tai J-Ala-A₂-A₃-A₄. Kun Y on Ala-Q, U on J-A₂-A₃-A₄. Kun Y on A₂-Q tai Ala-A₂-Q, U on J-A₃-A₄. Kun Y on A₂-A₃-Q tai Ala-A₂-A₃-Q, U on J-A₄. Kun Y on A₂-A₃-A₄-Q tai Ala-A₂-A₃-A₄-Q, U on J. V on A₅ tai Z. Kun V on A₅, W on A₆-Z tai Z. Kun V on Z, W:tä ei ole mukana. A₁, A₅, A₆ ja Z ovat kuten tässä määritettiin. Esillä olevassa tilanteessa A₂ on D⁸nal tai DPhe, ja A₄ on Trp.

Q on peptidifragmentin karboksipääterryhmä ja se on -OR³ tai -M, jossa M on osa, joka voidaan korvata tyypen sisältävällä nukleofiilillä, ja R³ on H, alkyyliryhmä, jossa on yksi - noin 10 hiiliatomia, aryyliiryhmä, jossa on 6 - noin 12 hiiliatomia, tai aryylialkyyliiryhmä, jossa on 7 - noin 12 hiiliatomia; J on annetun fragmentin amiinipääterryhmä, ja se on H tai suojaryhmä, joka ei estä liitosreaktiota, esimerkiksi bentsyyli.

Tämän jälkeen suojaryhmät poistetaan. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää näin muodostettua suojattua peptidiä seuraavissa kondensaatioissa suuremman peptidin valmistamiseksi.

Tämä edullinen menetelmä kuvataan täydellisemmin US-patenttihakemuksessa, jonka sarjanumero on _____ joka on jätetty 24. heinäkuuta 1990, keksijöinä John C. Hubbs ja S.W. Parker, otsikolla "Menetelmä peptidien syntetisointiseksi", joka liitetään tähän viitteellä.

Esillä olevan keksinnön toisen näkökohdan mukaan saadaan menetelmä, jolla edistetään kasvuhormonitasojen vapautumista ja/tai kohoamista eläimen veressä. Mainituksa menetelmässä annetaan eläimelle tehokas annos vähintään yhtä edellä kuvattua polypeptidiä.

Tämän keksinnön yhdisteet voidaan antaa suun kautta, ruoansulatuskanavan ulkopuolelle (lihakseen (i.m.)), vatsakalvoon (i.p.), suonensisäisesti (i.v.) tai ihon alle

(s.c.) injektiona), nenän kautta, emättimeen, peräsuoleen tai kielen alle, ja ne voidaan formuloida annosmuotoihin, jotka ovat sopivia kutakin antotapaa varten. Anto ruoansulatuskanavan ulkopuolelle on edullinen.

- 5 Kiinteitä annosmuotoja suun kautta tapahtuvaan antoon ovat kapselit, tabletit, pillerit, jauheet ja rakeet. Tällaisessa kiinteässä annosmuodossa vaikuttava yhdiste sekoitetaan vähintään yhden inertin kantaja-aineen, kuten sakkaroosin, laktoosin tai tärkkelyksen kanssa. Tällaiset
- 10 annosmuodot voivat sisältää, normaalikäytännön mukaisesti, lisäaineita, jotka eivät ole inerttejä laimentimia, esim. liukuaineita, kuten magnesiumstearaattia. Kapseleiden, tablettien ja pillereiden tapauksessa annosmuodot voivat sisältää myös puskuriaineita. Tablettit ja pillerit voidaan
- 15 lisäksi valmistaa suolessa hajoaviksi.

- Nestemäisiä annosmuotoja, jotka annetaan suun kautta, ovat emulsiot, liuokset, suspensiot, siirapit, eliksiirit, jotka sisältävät inerttejä yleisesti käytettäviä laimentimia, kuten vettä. Tällaisten inerttien laimentimien lisäksi koostumukset voivat sisältää apuaineita, kuten
- 20 kostutusaineita, emulgaattoreita ja suspensioivia aineita, ja makeutusaineita, maku- ja hajuaaineita. Tämän keksinnön mukaisia valmisteita, jotka annetaan ruoansulatuskanavan ulkopuolelle, ovat steriilit vesi- ja ei-vesiliuokset, suspensiot tai emulsiot. Esimerkkeinä ei-vesiliuottimista tai vehiikkeleistä ovat propyleeniglykoli, polyetyleniglykoli, kasvisöljyt, kuten oliiviöljy ja maissiöljy, gelatiini, ja injisoitavat orgaaniset esterit, kuten etyylioleaatti. Tällaiset lääke muodot voivat sisältää myös apu-
- 30 aineita, kuten säilöntä-, kostutus-, emulgointi- ja hajoamista edistäviä aineita. Ne voidaan steriloida esimerkiksi suodattamalla bakteereja pidättävän suodattimen läpi, lisäämällä steriloivaa ainetta koostumuksiin, säteilyttämällä koostumuksia tai kuumentamalla koostumuksia. Ne voidaan valmistaa myös väliaineeseen, joka on steriiliä vet-
- 35

tä, tai johonkin muuhun steriiliin injektiokelpoiseen väliaineeseen välittömästi ennen käyttöä.

Esillä olevan keksinnön uudet yhdisteet ovat myös käyttökelpoisia silloin, kun ne annetaan yhdessä kasvuhormonia vapauttavan hormonin kanssa (se on luonnollisesti esiintyvä kasvuhormonia vapauttava hormoni, sen analogit ja funktionaaliset vastineet), kuin myös yhdistelminä muiden sellaisten yhdisteiden kanssa, jotka edistävät kasvuhormonin vapautumista, esim. kasvuhormonia vapauttavien peptidien kanssa (katso US-patentti no. 4 880 778, joka liitetään tähän viitteellä). Tällaiset yhdistelmät edustavat erityisesti edullisia tapoja antaa esillä olevan keksinnön kasvuhormonia vapauttavia peptidejä, koska yhdistelmä edistää paljon useamman kasvuhormonin vapautumista kuin mitä odotetaan vapautuvan, laskettaessa yhteen yksittäiset vasteet kullekin yhdistelmän komponentille, eli yhdistelmän avulla saadaan synergistinen vaste, joka riippuu yksittäisestä komponentista. Lisäyksityiskohtia kasvuhormonia vapauttavien hormonien yhdistelmien annosta kuvataan edellä siteeratussa patentissa. Tällaiset synergistiset yhdisteet ovat edullisesti yhdisteitä, jotka toimivat agonisteina kasvuhormonia vapauttavan hormonin reseptoris-
sa tai estävät somatostatiinin vaikutuksen. Synergismi voi olla binaarista, se on esillä oleva yhdiste ja yksi synergistisistä yhdisteistä, tai siihen liittyy useampia kuin yksi synergistinen yhdiste.

Esillä olevan keksinnön polypeptidin tai polypeptidien yhdistelmän määrä riippuu useista tekijöistä, esim. tietystä hoidettavasta eläimestä, sen iästä ja sukupuolesta, halutusta terapeuttisesta vaikutuksesta, antotavasta ja siitä, mitä polypeptidiä tai polypeptidien yhdistelmää käytetään. Kaikissa tapauksissa käytetään kuitenkin annosta, joka on tehokas edistämään kasvuhormonitason vapautumista ja kohoamista vastaanottajaeläimen veressä. Tavallisesti tämä annostaso on noin 0,1 µg - 10 mg kokonaispoly-

peptidiä kg:a ruumiinpainoa kohden. Edullisen määrän voi asiantuntija helposti määrittää empiirisesti esillä olevan selostuksen perusteella.

- 5 Esimerkiksi ihmisille, kun anto tapahtuu suonensisäisesti, edullinen annostaso on noin 0,1 µg - 10 µg kokonaispolypeptidiä kg:a ruumiinpainoa kohden, edullisemmin noin 0,5 µg - 5 µg kokonaispolypeptidiä kg:a ruumiinpainoa kohden, edelleen edullisemmin noin 0,7 µg - noin 3,0 µg kg:a ruumiinpainoa kohden. Kun käytetään kasvuhormonia
- 10 vapauttavien peptidien yhdistelmiä, voidaan käyttää esillä kuvattuja määriä alhaisempia määriä. Esimerkiksi yhdistetäessä esillä kuvattu peptidi esimerkiksi I-ryhmään US-patentissa no. 4 880 778 kuuluvan synergistisen yhdisteen, kuten GHRH:n kanssa, edullinen annosraja on noin 0,1 µg -
- 15 noin 5 µg esillä kuvattua yhdistettä (esim. Ala-His-D^δNal-Ala-Trp-DPhe-A₆-Z, Ala-His-DPhe-Ala-Trp-Dhe-A₆-Z tai His-D^δNal-Ala-Trp-DPhe-A₆-Z) kiloa ruumiinpainoa kohden, ja noin 0,5 µg - noin 15,0 µg synergististä yhdistettä (esim. GHRH) ja edullisemmin noin 0,1 µg - noin 3 µg esillä olevaa yhdistettä sekä noin 1,0 µg - noin 3,0 µg synergististä yhdistettä kiloa ruumiinpainoa kohden.
- 20

- Suun kautta tapahtuvaa antotapaa käytettäessä tarvitaan yleensä suurempia määriä. Esimerkiksi annettaessa ihmisille suun kautta, annostaso on tavallisesti noin
- 25 30 µg - noin 600 µg polypeptidiä ruumiinpainoa kohden, edullisemmin noin 70 µg - noin 500 µg polypeptidiä ruumiinpainoa kohden, vielä edullisemmin noin 100 µg - noin 350 µg kokonaispolypeptidiä kiloa ruumiinpainoa kohden, vielä edullisemmin noin 200 µg - noin 300 µg kokonaispolypeptidiä kiloa ruumiinpainoa kohden. Lehmät tarvitsevat suurinpiirtein saman annostason kuin ihmisetkin, kun taas rotat tarvitsevat suurempia annostasoja. Tarkka taso voidaan helposti määrittää empiirisesti esillä olevaan selvi-
tykseen perustuen.
- 30

Yleisesti, kuten edellä mainittiin, annettaessa kasvuhormonia vapauttavia peptidejä yhdistelminä, samanlaisen vasteen aikaansaamiseksi käytettäviä yksittäisiä kasvuhormonia vapauttavia yhdisteitä voidaan antaa alhaisempina annoksina suhteessa tarvittaviin yksittäisten kasvuhormonia vapauttavien yhdisteiden annostasoihin yhdistelmän synergistisen vaikutuksen vuoksi.

Esillä olevaan keksintöön kuuluvat myös koostumukset, jotka sisältävät vaikuttavana aineosana edellä kuvattujen polypeptidien orgaanisia ja epäorgaanisia additiosuoloja sekä niiden yhdistelmiä; valinnaisesti yhdessä kantaja-aineen, laimentimen, hitaasti lääkeainetta vapauttavan matriisin tai päällysten kanssa.

Kasvuhormonia vapauttavien yhdisteiden orgaanisia ja epäorgaanisia additiosuoloja sekä niiden yhdistelmiä, jotka kuuluvat esillä olevan keksinnön suojapiiriin, ovat sellaiset orgaanisten osien suolat, kuten asetaatti, trifluoriasetaatti, oksalaatti, valeraatti, oleaatti, lauraatti, bentsoaatti, laktaatti, tosylaat, sitraatti, maleaatti, fumaraatti, suksinaatti, tartraatti, naftalaatti ja vastaavat suolat; sekä sellaisten epäorgaanisten osien, kuten ryhmän I (se on alkalimetallisuolat), ryhmän II (se on maa-alkalimetallisuolat) ammonium- ja protoammoniumisuolat, sinkki, rauta ja vastaavat, sekä vasta-ionit, kuten kloridi, bromidi, sulfaatti, fosfaatti ja vastaavat, kuin myös edellä viitatuut orgaaniset osat.

Farmaseuttisesti hyväksyttävät suolat ovat edullisia, kun ne annetaan ihmispotilaille. Tällaisia suoloja ovat myrkyttömät alkalimetalli-, maa-alkalimetalli- ja ammoniumsuolat, joita yleisesti käytetään farmaseuttisessa teollisuudessa, ja tällaisia ovat natrium-, kalium-, litium-, kalsium-, magnesium-, barium-, ammonium- ja protammoniumisuolat, jotka valmistetaan kemiassa hyvin tunnetuilla menetelmillä. Termi käsittää myös myrkyttömät happoadditiosuolat, jotka tavallisesti valmistetaan siten, että

saatetaan tämän keksinnön mukaiset yhdisteet reagoimaan sopivan orgaanisen tai epäorgaanisen hapon kanssa. Esimerkkeinä suoloista ovat hydrokloridi, hydrobromidi, sulfaatti, bisulfaatti, asetaatti, oksalaatti, valeraatti, oleaatti, lauraatti, boraatti, bentsoaatti, laktaatti, fosfaatti, tosylaatit, sitraatti, maleaatti, fumaraatti, suksinaatti, tartraatti, naftylaatti ja vastaavat suolat.

Keksintöä valaistaan edelleen seuraavilla ei-rajoittavilla esimerkeillä.

10 Esimerkki 1

Kasvuhormonia vapauttavien peptidien synteesi

Parametyyli-bentsyhydryyliamiinihydrokloridi- (pme-BHA·HCl) hartsia laitetaan reaktioastiaan kaupallisesti saatavaan automatisoituun peptidisyntetisaattoriin. Hartsi substituoidaan vapaalla amiinilla siten, että lisätty määrä on noin 5 mmol grammaa kohden. Yhdisteet valmistetaan liittämällä yksittäiset aminohapot, aloittaen peptidiketjun karboksipääterystä ja käyttäen sopivaa aktivoivaa ainetta, kuten N,N'-disykloheksyylikarbodi-imidiä (DCC). Yksittäisten aminohappojen alfa-amiini suojataan, esimerkiksi t-butylioksidikarbonyylijohtannaisena (t-Boc), ja reaktiiviset sivuketjun funktionaaliset ryhmät suojataan taulukossa 1 kuvatulla tavalla.

25 Taulukko 1

Kiinteä-faasi-peptidisynteesiin sopivia sivuketjun suojaryhmiä

Arginiini: N^g-tosyyli

Asparagiinihappo: O-bentsyyli

30 Kysteiini: S-para-metyyli-bentsyyli

Glutamiinihappo: O-bentsyyli

Histidiini: N^{im}-tosyyli

Lysiini: N^e-2,4-diklooribentsyylioksidikarbonyyli

Metioniini: S-sulfoksidi

35 Seriini: O-bentsyyli

Treoniini: O-bentsyyli

Tryptofaani: N¹⁹-formyyli

Tyrosiini: O-2,6-diklooribentsyyli

- 5 Ennen aloitusaminohapon liittämistä, hartsia sekoi-
tetaan kolme kertaa (noin yksi minuutti kerrallaan) dik-
loorimetaanin kanssa (CH_2Cl_2 ; noin 10 ml/g hartsia), se
neutraloidaan sekoittamalla kolme kertaa (noin kaksi mi-
nuuttia kullakin kerralla) dikloorimetaanissa olevan N,N-
10 di-isopropylietyyliamiinin (DIEA) kanssa (10:90; noin
10 ml/g hartsia), ja se neutraloidaan sekoittamalla kolme
kertaa (noin minuutti kerrallaan) dikloorimetaanin kanssa
(noin 10 ml/g hartsia). Aloitus- ja kukin seuraava amino-
happo liitetään hartsiin, käyttäen edeltä muodostettua
15 symmetristä anhydridiä, käyttäen noin 3,0-kertaista hart-
sin, jossa on sopivasti suojattu aminohappo, sitoutumis-
kapasiteetin kokonaismäärää ja noin 1,5-kertaista hartsin,
jossa on DCC:tä sopivassa määrässä dikloorimetaanina, si-
toutumiskapasiteetin kokonaismäärää. Aminohappoihin jotka
20 liukelevat heikosti dikloorimetaanin, lisätään N,N-dime-
tyyliformamidia (DMF) homogeenisen liuoksen aikaansaami-
seksi. Tavallisesti symmetrinen anhydridi valmistetaan
korkeintaan 30 minuuttia ennen sen lisäämistä reaktioasti-
aan lämpötilassa, joka on huoneenlämpötila tai sen alle.
25 Disykloheksyyliurea, joka muodostuu symmetrisen anhydridin
valmistamisen jälkeen, poistetaan suodattamalla liuos re-
aktioastiaan omapainosuodatuksella. Aminohapon hartsiin
liittymisen edistymistä valvotaan värireaktiolla, käyttäen
reagenssia, kuten ninhydriiniä (joka reagoi primaaristen
30 ja sekondaaristen amiinien kanssa). Kun suojatun aminoha-
pon liittyminen hartsiin on tapahtunut (> 99 %), alfa-
amiinin suojaryhmä poistetaan käsittelemällä happaman rea-
genssin (reagenssien) kanssa. Yleisesti käytetty reagenssi
koostuu liuoksesta, jossa on trifluorietikkahappoa (TFA)
35 ja anisolia dikloorimetaanissa (45:2:53). Täydellinen me-

netelmä kunkin yksittäisen aminohappotähteen liittämiseksi hartsiin kuvataan taulukossa 2.

Taulukko 2

5 Menetelmä yksittäisten aminohappojen liittämiseksi hartsiin

	Reagenssi	Sekoitukset	Aika/sekoitus
10	1. Dikloorimetaani	3	1 min.
	2. TFA, Anisoli, dikloorimetaani (45:2:53)	1	2 min.
	3. TFA, Anisoli, dikloorimetaani (45:2:53)	1	20 min.
	4. Dikloorimetaani	3	1 min.
15	5. DIEA, dikloorimetaani (10:90)	3	2 min.
	6. Dikloorimetaani	3	1 min.
	7. Ennalta valmistettu symmetrinen anhydridi	1	15-120 min.*
	8. Dikloorimetaani	3	1 min.
20	9. Isopropaani	3	1 min.
	10. Dikloorimetaani	3	1 min.

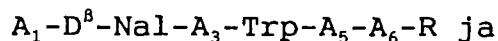
11. Liitosreaktion valvontamenetelmä **

25 12. Toistetaan vaiheet 1 - 12 kullekin yksittäiselle aminohapolle.

* Liitosaika riippuu yksittäisestä aminohaposta.

** Liitoksen laajuuttaa voidaan tavallisesti valvoa väritestillä. Jos liitos ei ole täydellinen, sama aminohappo voidaan liittää uudelleen toistamalla vaiheet 7 - 11. Jos liitos on tapahtunut täydellisesti, seuraava aminohappo voidaan liittää.

35 Käyttämällä tätä peptidisynteesimenetelmää, saadaan uusia hartsiin sidottuja polypeptidejä, jollaisia ovat:



A_1 -DPhe- A_3 -Trp- A_5 - A_6 -R (joissa A_1 , A_3 , A_5 ja A_6 ovat kuten edellä määritettiin ja R on polymeeriharts, ja aminohapporakenneosien funktionaaliset ryhmät suojataan tarvittaessa sopivilla suojaryhmillä). Erityisiä ketjuja (sopivasti suojatussa muodossa), joita on valmistettu, ovat:

- 5
- His- D^β Nal-Ala-Trp-DPhe-Lys- R ,
 Ala-His- D^β Nal-Ala-Trp-DPhe-Lys- R ,
 Ala-His-DTrp-Ala-Trp-DPhe-Lys- R ,
 10 His-Ala-DTrp-Ala-Trp-DPhe-Lys- R ,
 His- D^α Nal-Ala-Trp-DPhe-Lys- R ,
 His-DAsp-Ala-Trp-DPhe-Lys- R ,
 His-DCys(SMe)-Ala-Trp-DPhe-Lys- R ,
 His-DTrp-Ala-Trp-DPhe-Ala-Lys- R ,
 15 His- D^β Nal-Ala-Trp-DPhe-Ala-Lys- R ,
 Ala-His- D^β Nal-Ala-Trp-DPhe-Ala-Lys- R ,
 Try-DArg-Phe-Gly- R,
 Ala-His-Dphe-Ala-Trp-DPhe-Lys- R
 Ala-His-DHis-Ala-Trp-DPhe-Lys- R, ja
 20 Ala-His-DPro-Ala-Trp-DPhe-Lys- R

Esimerkki 2

Kasvuhormonin vapautuminen in vivo rotissa

Ei-täysikasvuisia Sprague-Dawley-naarasrottia saatiin Charles River Laboratorioista (Wilmington, MA). Saapumisensa jälkeen niitä pidettiin 25 °C:ssa 14:10 tunnin valoisa:pimeärytmissä. Vettä ja Purina-rotanruokaa oli saatavilla mielin määrin. Poikasia pidettiin niiden emojen kanssa, kunnes ne olivat 21 päivän ikäisiä.

21 päivää vanhoja rottia, kuusi rottia käsittelyryhmää kohden, nukutettiin antamalla niille vatsaonteloon 50 mg/kg pentobarbitaalia 20 minuuttia ennen suonensisäisesti annettavaa peptidiä. Normaali suolaliuos ja 0,1-%:inen gelatiini olivat vehiikkelinä peptidien suonensisäisesti annettavissa injektioissa. Nukutetuille rotille, jotka painoivat 55 - 65 grammaa, annettiin suonensi-

säisenä injektiona taulukoissa 3, 4 ja 5 ilmoitetut määrät kasvuhormonia vapauttavia yhdisteitä. Injektio annettiin 0,2 ml:n liuoksena kaulalaskimoon.

5 Kaikki eläimet lopetettiin giljotiinilla 10 minuutin kuluttua viimeisestä injektioista (katso taulukot 3 ja 4). Vartalon veri otettiin talteen pään katkaisun jälkeen veren kasvuhormonitasojen määrittämiseksi. Kun veren oli annettu hyytyä, se sentrifugoitiin ja seerumi erotettiin hyytymästä. Seerumia pidettiin jäädytettynä siihen päivään
10 asti, kunnes siitä otettiin näytteitä kasvuhormonitasojen radioimmunologista (RIA) määrittystä varten seuraavan menetelmän mukaisesti, joka menetelmä on kehitetty Kansallisessa nivelreuma-, sokeritauti- ja ruoansulatus- ja munuaissairauksien instituutissa (NIADDK).

15 Reagenssit lisätään tavallisesti analyysiputkiin yhdellä kertaa jääkaappilämpötilassa (4 °C) seuraavassa järjestyksessä:

- (a) puskuri,
- (b) "kylmä" (se on ei-radioaktiivinen) standardi
20 tai tutkittava tuntematon seeruminäyte,
- (c) radioaktiivisella jodilla merkitty kasvu-
hormoniantigeeni ja
- (d) kasvuhormoniantiseerumi.

Reagenssilisäys suoritetaan tavallisesti siten,
25 että lopulliseksi RIA-putkilaimennokseksi saadaa noin 1:30 000 (antiseerumi:kokonaisnestetilavuus vol:vol).

Sekoitettuja reagensseja inkuboidaan sitten tavallisesti huoneenlämpötilassa (noin 25 °C) noin 24 tuntia ennen toisen vasta-aineen lisäämistä (esim. vuohen tai
30 kanin anti-apina-gammaglobuliiniseerumi), joka vasta-aine sitoutuu siihen ja saa aikaan kompleksoituneen kasvuhormoniantiseerumin saostumisen.

RIA-putkien saostuneista sisällöistä analysoidaan sitten lukemien määrä tietyssä ajanjaksona gamma-tuikelaskimella. Standardisuora piirretään radioaktiivisina luke-
35

mina kasvuhormonitason funktiona. Tuntemattomien näytteid-
den kasvuhormonitasot määritetään sitten standardisuoran
perusteella.

5 Seerumin kasvuhormoni mitattiin RIA:n avulla sekä
reagensseilla, jotka on saatu Kansallisesta hormoni- ja
aivolisäkeohjelmasta.

10 Taulukoissa 3, 4, 5 ja 6 olevat seerumitasot merki-
tään ylös ng/ml:na rotan kasvuhormonistandardin muodossa,
joka on 0,61 kansainvälistä yksikköä/mg (IU/mg). Tiedot
tallennetaan keskiarvona +/- keksiarvon keksivirheenä
(SEM). Tilastanalyysi suoritettiin Studentin t-testillä.
NS tarkoittaa, että ero ei ollut tilastollisesti merkitse-
vä. Taulukoissa 3, 4, 5 ja 6 esitetyt tulokset ovat keski-
arvoja kuudella rotalla suoritetuista tutkimuksista.

15

Taulukko 3

Kasvuhormonia vapauttavilla yhdisteillä edistetty
kasvuhormonin vapautuminen (ng/ml) in vivo pento-
barbitaalilla nukutetuissa rotissa

20 (Eläimet lopetettiin 10 minuutin kuluttua viimei-
sestä injektioista)

	Sarake A Kasvuhormonia Vapauttavat yhdisteet	Kokonais- annos (μ g)	Vertailu- kasvuhormoni GH ng/ml	Sarakkeen A yhdisteen vapauttava kasvuhormoni	
				ng/ml $\pm$ SEM	p-arvo
25	His-DTrp-Ala-Trp-	0,1	151 $\pm$ 16	246 $\pm$ 39	-
	DPhe-Lys-NH ₂	0,3	151 $\pm$ 16	670 $\pm$ 75	-
		1,0	151 $\pm$ 16	1000 $\pm$ 276	-
		3,0	151 $\pm$ 16	2106 $\pm$ 216	-
30	His-D ^{β} NaI-Ala-	0,1	151 $\pm$ 16	938 $\pm$ 255	< 0,02
	Trp-DPhe-Lys-NH ₂ -	0,3	151 $\pm$ 16	1716 $\pm$ 258	< 0,02
		1,0	151 $\pm$ 16	3728 $\pm$ 691	< 0,01
		3,0	151 $\pm$ 16	3238 $\pm$ 273	< 0,01

5	His-DTrp-Ala-	0,1	138 ± 12	226 ± 31	-
	Trp-DpHe-Lys-NH ₂	0,3	138 ± 12	613 ± 73	-
		1,0	138 ± 12	1581 ± 228	-
		3,0	138 ± 12	2875 ± 393	-
10	Ala-His-DTrp-Ala-	0,1	138 ± 12	254 ± 78	NS -
	Trp-DPHe-Lys-NH ₂	0,3	138 ± 12	809 ± 59	NS -
		1,0	138 ± 12	1516 ± 215	NS -
		3,0	138 ± 12	3095 ± 473	NS -
15	Ala-His-D ^β NaI-	0,1	138 ± 12	1128 ± 309	< 0,02 < 0,02
	Ala-Trp-DPHe-Lys-NH ₂	0,3	138 ± 12	2479 ± 389	< 0,001 < 0,001
		1,0	138 ± 12	3899 ± 514	< 0,001 < 0,001
		3,0	138 ± 12	4202 ± 369	< 0,05 NS
20	Ala-His-DTrp-Ala-Trp-	0,1	111 ± 25	360 ± 35	-
	DPHe-Lys-NH ₂	0,3	111 ± 25	903 ± 217	-
		1,0	111 ± 25	2957 ± 427	-
		3,0	111 ± 25	3956 ± 485	-
20	Ala-His-D ^β NaI-	0,1	111 ± 25	970 ± 169	< 0,01
	Ala-Trp-DPHe-Lys-NH ₂	0,3	111 ± 25	2898 ± 247	< 0,001
		1,0	111 ± 25	3908 ± 327	NS

Taulukko 4

Kasvuhormonia vapauttavilla yhdisteillä edistetty kasvuhormonin vapautuminen (ng/ml) in vivo pento-barbitaalilla nukutetuissa rotissa

5 (Eläimet lopetettiin 10 minuutin kuluttua viimeisestä injektioista)

	Sarake A Kasvuhormonia vapauttavat yhdisteet	Vertailukasvu hormoni GH ng/ml	Kokonais- annos (μg)	Sarakkeen A yhdisteen vapauttava kasvuhormo- ni ng/ml
10	AlaHisDTrpAlaTrpDPheLysNH ₂	111 ± 25	0,3	901 ± 21
	AlaHisDPheAlaTrpDPheLysNH ₂	181 ± 69	0,3	616 ± 74
15	AlaHisDHisAlaTrpDPheLysNH ₂	117 ± 19	0,3	268 ± 54
	AlaHisDProAlaTrpDPheLysNH ₂	117 ± 19	0,3	262 ± 51

Taulukko 5

	Peptidi	Kokonais- annos (μg)	vertailukas- vuhormoni GH ng/ml	Vapautunut kasvuhormoni ng/ml
20				
	His-DAsp-Ala-Trp-	1,0	150 ± 20	154 ± 63
25	DPhe-Lys-NH ₂	3,0	150 ± 20	155 ± 34
		10,0	150 ± 20	163 ± 44
		30,0	150 ± 20	224 ± 62
		100,0	150 ± 20	178 ± 83
30	His-DCys(SMe)-Ala-	0,3	181 ± 69	178 ± 28
	Trp-DPhe-Lys-NH ₂	1,0	181 ± 69	193 ± 28
		3,0	181 ± 69	180 ± 34
35	His-D ^α NaI-Ala-	0,1	151 ± 16	280 ± 70
	Trp-DPhe-Lys-NH ₂	0,3	151 ± 16	439 ± 122
		1,0	151 ± 16	1130 ± 179
		3,0	151 ± 16	2319 ± 139

5	His-DTrp-Ala-Trp-DPhe-Lys-NH ₂	0,1	181 ± 69	512 ± 43
		0,3	181 ± 69	566 ± 114
		1,0	181 ± 69	1531 ± 303
		3,0	181 ± 69	2349 ± 267
10	His-DTrp-Ala-Trp-DPhe-Ala-Lys-NH ₂	0,1	220 ± 29	420 ± 105
		0,3	220 ± 29	900 ± 163
		1,0	220 ± 29	1965 ± 366
		3,0	220 ± 29	4553 ± 670
15	His-D ^β Nal-Ala-Trp-DPhe-Ala-Lys-NH ₂	0,1	111 ± 25	484 ± 89
		0,3	107 ± 16	971 ± 241
		1,0	107 ± 16	1593 ± 359
		3,0	107 ± 16	3337 ± 583
20	His-Ala-DTrp-Ala-Trp-DPhe-Lys-NH ₂	0,1	111 ± 25	-
		0,3	151 ± 16	261 ± 32
		1,0	151 ± 16	830 ± 103
		3,0	151 ± 16	2588 ± 341

25 Taulukoista 3, 4, 5 ja 6 käy ilmi, että keksinnön mukaiset yhdisteet edistävät kasvuhormonitasojen vapautumista ja kohoamista sellaisten rottien veressä, joille tällaisia yhdisteitä on annettu. Esillä olevan keksinnön peptideillä ilmenee vaikutusta, kun taas vastaavilla yhdisteillä, joissa A₂-asema on substituoitu (esim. DAsp, DCys(SMe), DHis ja DPro) ei ilmene tällaista vaikutusta.

30 Nämä tabletit osoittavat myös, että His-D^βNal-Ala-Trp-DPhe-Lys-NH₂ on vaikuttavampi kuin yhdisteet, joissa on DTrp, D^αNal, DAsp ja Dcys A₂-asemassa. Samalla tavoin Ala-His-D^βNal-Ala-Trp-DPhe-Lys-NH₂ on vaikuttavampi kuin vastaava DTrp-yhdiste.

Esimerkki 3

Kasvuhormonia vapauttavien yhdisteiden yhdistelmän anto

Esimerkin 2 menetelmä toistettiin, paitsi, että rottia ei nukutettu eikä niitä esikäsitelty pentobarbitaallilla, ja peptidien yhdistelmä annettiin rotille. Annetut yhdisteet, annostaso ja tulokset esitetään taulukossa 6.

Taulukko 6

Kasvuhormonia vapauttavilla yhdisteillä edistetty kasvuhormonin vapautuminen in vivo pentobarbitaallilla nukutetuissa rotissa

(Eläimet lopetettiin 10 minuutin kuluttua viimeisestä injektioista)

15

Sarake A Kasvuhormonia vapauttava peptidi	Kokonais- annoa (μg)	Vertailu seeruminkas- vuhormoni ng/ml	Vapautunut kasvu- hormoni seerumin seerumin kasvuhormoni ng/ml
		$\pm$ SEM (N=6)	$\pm$ SEM (N=6)

20

Ala-His-D β Nal-	0,1	337 $\pm$ 51	610 $\pm$ 90
Ala-Trp-DPhe-Lys-NH ₂	0,3	337 $\pm$ 51	1140 $\pm$ 187
	1,0	337 $\pm$ 51	2909 $\pm$ 257
	3,0	337 $\pm$ 51	3686 $\pm$ 436

25

Ala-D β Nal-Ala-			
Trp-DPhe-Lys-NH ₂	0,3	167 $\pm$ 46	363 $\pm$ 73
	1,0	167 $\pm$ 46	1450 $\pm$ 294
	3,0	167 $\pm$ 46	2072 $\pm$ 208
	10,0	167 $\pm$ 46	2698 $\pm$ 369

30

Ala-His-D β Nal-Ala-			
Trp-DPhe-Lys-NH ₂	0,3	160 $\pm$ 51	1418 $\pm$ 302
	1,0	160 $\pm$ 51	2201 $\pm$ 269

35

5	Ala-His-DβNaI-Ala-		
	Trp-DPhe-Lys-NH ₂	0,3	228 ± 23
		1,0	228 ± 23

10	Ala-His-DβNaI-Ala-		
	Trp-DPhe-Lys-NH ₂	0,1	160 ± 36
		0,3	160 ± 36
		1,0	160 ± 36

Taulukko 7

Keksinnön yhdisteen synergistiset vaikutukset nukuttamattomissaa rotissa in vivo ryhmän 1 ja ryhmän 3 yhdisteillä

15	Annettu yhdiste			Annos (μg)	Vapautunut kasvuhormoni (ng/mL)
					± SEM
	Vertailu	-	-	-	12 ± 3
	175-1 ^a	-	-	1	58 ± 13
	175-1	-	-	3	240 ± 32
20	C ^b	-	-	10	204 ± 50
	GHRH ^c	-	-	3	131 ± 50
	TP ^d	-	-	10	79 ± 29
25	175-1	GHRH	-	1 + 3	2014 ± 224
	175-1	TP	-	1 + 10	987 ± 204
	175-1	GHRH	TP	1 + 3 + 10	4150 ± 555
	175-1	GHRH	-	3 + 3	1994 ± 249
	175-1	TP	-	3 + 10	2149 ± 451
	175-1	GHRH	TP	3 + 3 + 10	2922 ± 384
30	C	GHRH	-	10 + 3	2525 ± 453
	C	TP	-	10 + 10	159 ± 387
	C	GHRH	TP	10 + 3 + 10	4344 ± 374

* Ryhmän 1 ja 3 yhdisteet kuvataan yksityiskohtaisemmin US-patentissa no. 4 880 778.

a - 175-1 = Gus-D⁶Nal-Ala-Trp-DPhe-Lys-NH₂ (keksinnön yhdiste)

b - C = His-DTrp-Ala-Trp-DPhe-Lys-NH₂ (vertailu yhdiste)

5 c - GHRH = Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-
Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-
Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-
Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-
AsD-Ile-Nle-Ser-Arg-NH₂
10 (1-ryhmän yhdiste)

d - TP = Tyr-DArg-Phe-Gly-NH₂ (3-ryhmän yhdiste)

Taulukko 7 osoittaa, että keksinnön yhdiste antaa synergistisen vasteen, kun se annetaan yhdessä esimerkkiyhdisteiden, ryhmän 1 ja ryhmän 3 yhdisteiden kanssa. Taulukon 7 tuloksista käy edelleen ilmi, että keksinnön yhdisteellä on suurempi synergistinen vaste kuin vertailuyhdisteellä (C) saatu vaste, jolla yhdisteellä on aikaisemmin osoitettu olevan synergistinen vaste.

20 **Esimerkki 4**

Peptidifragmenttien kondensaatioreaktio pepetidin muodostamiseksi

Yleiset menetelmät

25 Sulamispisteet voidaan määrittää Thomas Hooverin kapillaarisulamispisteenmäärittäyslaitetta käyttäen. Infra-
puna (IR) -spektrit voidaan tallentaa Perkin-Elmer Model 137 tai Nicolet Model 5DX -spektrofotometrillä ja ilmaista aaltolukuina (cm⁻¹). Massaspektrit (MS) voidaan saada käyttäen VG Analytical Ltd. Model ZAB-IF -massaspektrometriä
30 EI- (elektronitörmäys), FD- (kentän desorptio) tai FAB- (nopea atomipommitus) tavoilla. GCMS voidaan saada käyttäen Finnigan 4023 GCMS:ä, joka on varustettu 30 m DB5 -kapillaarikolonilla (J & W Scientific), käyttäen heliumia kantajakaasuna. Optiset kiertokyvyt voidaan mitata käyttä-

en Autopol III -polarimetriä, jota valmistaa Rudolph Research.

¹H NMR -spektrit voidaan saada JEOL GX-400 NMR -laitteella, käyttäen 400 MHz:ä, tai JEOL GX-270 NMR -laitteella, käyttäen 270 MHz:ä. Näillä laitteilla pystytään rutiininomaiseen digitaaliseen erotukseen, joka on vähemmän kuin 0,7 Hz. Kemialliset siirtymät ilmoitetaan miljoonasosina suhteessa sisäiseen 3-(trimetyylisilyyli)-tetradeuteronatriumpropionaattiin (TSP).

Suuren erotuskyvyn omaava nestekromatografointi (HPLC) voidaan suorittaa käyttäen Hitachi-järjestelmää, joka koostuu L-5000-gradientinsäätimestä ja 655A-pumpusta, joka on kytketty Vydac 201TP1010 tai 218TP1010 -puolivalmistavaan kolonniin. Yhdistelmiä, joissa on vettä, joka sisältää 0,2-%:ista trifluorietikkahappoa ja metanolia, voidaan käyttää eluointiliuottimena. Tavallisesti kiinnostavat yhdisteet eluoidaan virtausnopeudella, joka on kuusi ml minuutissa, käyttäen gradienttiltaan kasvavaa orgaanista komponenttia, joka on suuruudeltaan noin 1 - 2 % minuutissa. Yhdisteet detektoidaan sitten sopivilla aallonpituuksilla, käyttäen LKB 2140, diodirivillä varustettua UV-detektoria. Integroinnit voidaan sitten suorittaa käyttäen Nelsonin analyttisiä ohjelmia (versio 3.6).

Reaktiot suoritetaan inertissä typpi- tai argonatmosfäärissä, ellei toisin mainita. Vedetön tetrahydrofuraani (THF, UV-laatu) ja dimetyyliformamidi (DMF) voidaan ostaa Burdick and Jackson'ilta ja käyttää suoraan pullosta.

A. Tripeptidifragmentin - $\text{NH-Trp-DPhe-Lys(Boc)-NH}_2$ valmistus

N^α-bentsyylioksidikarbonyyli-(N^ε-t-butoksidikarbonyyli)-lysiiniamidi, 4.

10-°C:iseen liuokseen, jossa on karbonyylidi-imidatsolia (CDI, 2, 88,24 g, 0,544 mol) ja kuivaa tetrahydrofuraania (THF, 1500 ml), lisätään hitaasti N(CDCl₃) N^α-

bentsyylioksidikarbonyyli-(N^ε-t-butoksidikarbonyyli)lysiiniä (1, 180 g, 0,474 mol). Lisäyksen aikana on havaittavissa kaasun kehitystä. N^ε-bentsyylioksidikarbonyyli-(N^ε-t-butoksidikarbonyyli)lysiini-imidatsoliviluotteen, 3, muodostuessa

5 valmistetaan kylläinen liuos, jossa on ammoniakkia ja THF:a (2 000 ml) (vedetöntä NH₃-kaasua johdetaan THF:iin 5 - 10 °C:ssa). Kun välituotteen 3 on todettu muodostuneen (kun kaasun kehitys on päättynyt, noin 2 tuntia), puolet THF-liuoksesta, joka sisältää 3:a, lisätään 30 minuuttia

10 myöhemmin. Ammoniakkikaasun annetaan virrata jatkuvasti lisäyksen aikana ja 45 minuuttia tämän jälkeen. Kun kaksi 3:a sisältävää liuosta on lisätty, muodostuu valkoinen saostuma. Reaktion annetaan lämmetä huoneenlämpötilaan ja sitä sekoitetaan 15 tuntia. Liuotin poistetaan suspensios-

15 ta tyhjöissä. Jäännös suspensoidaan veteen ja syntynyt kiinteä aine otetaan talteen tyhjösuodattamalla.

N^ε-t-butoksidikarbonyyli-lysiini-amidi, 5.

Liuos, jossa on lysiiniamidia 4 (181,48 g, 0,479 mol) metanolissa (MeOH, 1 000 ml), lisätään katalyyttisuspensioon, jossa on 5-%:ista Pd/C:a (5 g) metanolissa

20 (250 ml) argonatmosfäärissä. Vedyä annetaan kuplia reaktionseokseen (n. 15 minuuttia) ja reaktiota sekoitetaan sitten vetyatmosfäärissä, kunnes HPLC-analyysi osoittaa, että reaktio on päättynyt (36 tuntia). Vetyatmosfääri korvataan sitten argonilla. Reaktioliuos kirkastetaan Celite[®]-suodattimen läpi ja liuotin poistetaan tyhjöissä, jolloin saadaan kiinteää ainetta.

25

N^ε-bentsyylioksidikarbonyyli-D-fenyylialaniini-(N^ε-t-butoksidikarbonyyli)lysiini-amidi, 8.

N^ε-bentsyylioksidikarbonyyli-D-fenyylialaniinia (6, 126,39 g, 0,423 mol) lisätään hitaasti 10-°C:iseen liuokseen, jossa on CDI:tä (2, 66,03 g, 0,409 mol) THF:ssa (500 ml). Kaasun kehitystä on havaittavissa lisäyksen aikana. Kun kaasun kehitys on päättynyt, lysiiniamidi 5

30 (110,75 g, 0,452 mol) lisätään THF-liuoksena (500 ml).

35

Noin 48 tunnin kuluttua seos suodatetaan kiinteään aineen poistamiseksi. Suodos väkevöidään tyhjössä.

Syntynyt jäännös otetaan talteen etyyliasetaattiin (EtOAc, 500 ml) ja pestään sitten seuraavalla tavalla erotussuppilossa:

1. HCl:n vesiliuos (1 N, 3 x 500 ml) pesuliuoksen 1 pH noin 8; tämän jälkeen pesuliuosten pH:t 1,

2. vesi (500 ml),

3. Na₂CO₃:n vesiliuos (puolikylläinen, 2 x 500 ml),
suodatetaan kiteisen kiinteään aineen talteen ottamiseksi (8),

4. vesi (3 x 500 ml).

Orgaaninen kerros kuivataan MgSO₄:lla. Kirkastamisen jälkeen liuotin poistetaan tyhjössä. Syntynyt jäännös voidaan uudelleenkiteyttää kuumasta EtOAc:sta, jolloin saadaan toinen näyte 8:a.

D-fenyylialanyyli-(N^ε-t-butoksikarbonyyli)lysiini-amidi, 9.

Metanolipitoinen liuos (1 500 ml) amidia 8 (120,53 g, 0,229 mol) lisätään katalyyttisuspensioon, jossa on 5-%:ista Pd/C:tä (50 g) MeOH:ssa (200 ml). Argonatmosfääri korvataan vedyllä. Kun HPLC-analyysi osoittaa, että reaktio on päättynyt (n. neljä tuntia), vetyatmosfääri korvataan argonilla. Reaktioliuos kirkastetaan sitten Celite® -suodattimen läpi ja suodos haihdutetaan jäännökseksi tyhjössä. Tätä dipeptidituotetta voidaan käyttää suoraan tripeptidin 12 valmistuksessa.

N^α-bentsyylioksikarbonyyli-tryptofyyli-D-fenyylialanyyli-(N^ε-t-butoksikarbonyyli)lysiini-amidi, 12.

10-°C:ista liuosta, jossa on N^α-bentsyylioksikarbonyyli-tryptofaania (10, 67,60 g, 0,200 mol), THF:a (500 ml) ja CDI:tä (2, 33,05 g, 0,204 mol), sekoitetaan, kunnes kaasun kehitys on päättynyt. Liuos, jossa on 9:ää (40,8 g, 0,103 mol) THF:ssa (n. 200 ml), lisätään sitten reaktioseokseen. Syntyneen liuoksen annetaan reagoida 15

minuutin ajan, lämmittäen sitä samalla huoneenlämpötilaan. Muodostunut kiinteä aine otetaan sitten talteen tyhjösuodattamalla. Suodoksesta saadaan jäännös väkevöimällä tyhjössä. Syntynyt jäännös ja kiinteä aine yhdistetään ja otetaan alteen EtOAc:iin (4 000 ml), heikosti lämmittäen. Kun liuos on jäähdytetty huoneenlämpötilaan, muodostuu kiinteää ainetta. Kiinteä aine otetaan talteen tyhjösuodattamalla. Tämä kiinteä aine uudelleenkiteytetään kuumasta MeOH:sta, jolloin saadaan puhdistettua tripeptidiä 12. EtOAc-suodos (ensimmäisestä kiteytyksestä) pestään seuraavalla tavalla erotussuppilossa:

1. HCl:n vesiliuos (1 N, 2 x 500 ml),
2. vesi (1 x 500 ml),
3. Na₂CO₃:n vesiliuos (puolikiylläinen, 2 x 500 ml),
4. NaCl:n vesiliuos (1 x 500 ml).

Orgaaninen kerros kuivataan MgSO₄:lla ja kirkastetaan sitten tyhjösuodattamalla. Suodoksen liuotin poistetaan tyhjössä. Syntynyt jäännös otetaan jälleen talteen EtOAc:iin, jolloin saadaan kuivaa kiinteää ainetta. Kiinteälle aineelle voidaan suorittaa uudelleenkiteytys kuumasta MeOH:sta, jolloin saadaan toinen erä 12:ta valkoisena kiinteänä aineena.

Tryptofyyli-D-fenyylialanyyli-(N^ε-t-butyylisikarbonyyli)lysiini-amidi 13.

Metanolipitoinen liuos (1 500 ml), jossa on tripeptidiä 12 (64,59 g, 0,091 mol), lisätään katalyyttisuspensioon, jossa on 5-%:ista Pd/C:tä (5 g) ja MeOH:a (250 ml) argonatmosfäärissä. Lisätään vielä MeOH:a (2 250 ml). Argonatmosfääri korvataan vedyllä ja annetaan reagoida (n. 24 tuntia). Kun reaktio on päättynyt, vetyatmosfääri korvataan argonilla. Liuos kirkastetaan Celite[®] -suodattimen läpi ja suodos väkevöidään tyhjössä, jolloin saadaan tripeptidiä 13 valkoisena kiinteänä aineena.

B. Tripeptidifragmentin - K-His-D^NNal-Ala-OMe valmistaminen

N^α-bentsyylioksikarbonyyli-histidyyli-D-beta-naftyyli-lialaniinimetyyliesteri 25.

5 Liuosta, jossa on EtOAc:a (400 ml) ja D-beta-naftyyli-lialaniinimetyyliesterihydrokloridia (22, 0,62 ol) pestään kylläisellä natriumkarbonaatilla (400 ml) ja 0,8 N:isella natriumhydroksidin vesiliuoksella (n. 500 ml). Syntynyt vesifaasi poistetaan (pH 8,5) ja orgaaninen faasi
10 pestään sen jälkeen puolikylläisellä Na₂CO₃:n vesiliuoksella (150 ml) ja sitten vedellä (50 ml). 22:n vapaa emäsmuoto eristetään sen jälkeen, kun etyyliasetaattikerros on väkevöity tyhjössä.

 Disykloheksyylikarbodi-imidiä (DCC, n. 95 g, 0,46 mol) lisätään -5-°C:iseen (jää-etanolihaude) liuokseen, jossa on N^α-bentsyylioksikarbonyyli-histidiiniä (19, 143,5 g, 0,50 mol), N-hydroksisuksinimidiä (HONSu, 23, 0,62 mol) ja juuri valmistettua 22:n vapaata emäsmuotoa (n. 0,52 mol) DMF:ssa (n. 3 l). Syntyneen reaktioliuoksen
15 annetaan sekoittua 24 tuntia, sen samalla lämmitessä huoneenlämpötilaan. HPLC-analyysiä tulee käyttää, jotta nähdään onko reaktio päättynyt. Mikäli se ei ole päättynyt, reaktioliuos jäähdytetään sitten noin -5 °C:seen ja lisätään vielä annos disykloheksyylikarbodi-imidiä (n.
20 0,17 mol) reaktioon. Reaktioseoksen annetaan sitten sekoittua vielä 24 tuntia, sen samalla lämmitessä huoneenlämpötilaan. Seos suodatetaan sitten disykloheksyyliurean (DCU) poistamiseksi. Suodokseen lisätään vettä (1 l) ja syntynyt liuos väkevöidään tyhjössä. Syntynyt jäännös otetaan talteen 1-N:iseen HCl:n vesiliuokseen (n. 1 l, kunnes vesifaasin pH on 1). Vesifaasi uutetaan sitten kahdesti etyyliasetaatilla (1 l kummallakin kerralla). Etyyliasetaattikerrokset heitetään pois. Vesifaasin pH säädetään
25 sitten lisäämällä kylmää 2-N:ista natriumhydroksidia (500 ml) ja natriumhydroksidipellettejä. Tämän neutraloin-

nin aikana liuos pidetään kylmänä lisäämällä kylmää etyyliasettaattia (1 l). Kun vesifaasin pH on noin 7, saostuu tavallisesti runsaasti valkoista kiinteää ainetta tai öljyä. Tämä saostuma otetaan talteen tyhjösuodattamalla tai

5 dekanttoimalla ja pestään peräkkäin puolikylläisellä natriumkarbonaatilla (2 x 1 500 ml), vedellä (6 x 1 500 ml) ja etyyliasettaatilla (3 x 1 500 ml). Syntynyt aine kuivataan korkeatyhjössä vakiopainoonsa. Tämä aine voidaan hydrolysoida suoraan ilman lämpökäsittelyä.

10 DPhe-peptidi voidaan valmistaa käyttäen D-fenyylialaniinimetyyliesterihydrokloridia yhdisteenä 22 D-beta-naftyyli-alaniinimetyyliesterihydrokloridin sijaan.

N^α-bentsyylioksikarbonyyli-histidyyli-β-naftyyli-D-alaniini, 26.

15 Natriumhydroksidin vesiliuosta (192 ml, liuos, jossa on 0,08 g/ml, 0,38 ml) lisätään liuokseen, jossa on dipeptidiä 25 (n. 0,38 mol), vettä (360 ml) ja MeOH:a (n. 6 l). Liuosta sekoitetaan huoneenlämpötilassa, kunnes hydrolyysi on tapahtunut täydellisesti (n. 24 tuntia). Lähtö-

20 ainepeptidin häviäminen osoitetaan HPLC-analyysin avulla. Liuos väkevöidään tyhjössä jännökseksi, joka liuotetaan veteen (n. 1 l). Vesikerros (pH n. 10) uutetaan sitten EtOAc:lla (2 x 500 ml) erotussuppilossa. Etyyliasettaattikerrokset heitetään pois. Syntyneen vesifaasin pH säädetään arvoon, joka on noin 5, väkevällä HCl:lla, jolloin saostuu tavallisesti saostuu valkoista kiinteää ainetta tai muodostuu öljyä. Tuote otetaan talteen ja kuivataan tyhjössä.

25 **N^α-bentsyylioksikarbonyyli-histidyyli-D-beta-naftyyli-alanyyli-alaniinimetyyliesteri, 20.**

30 Dipeptidi N^α-bentsyylioksikarbonyyli-histidyyli-D-beta-naftyyli-alaniini (26, 0,253 mol) lisätään liuokseen, jossa on HONSu:a (23, 0,505 mol) DMF:ssä (800 ml) argonatmosfäärissä. Tähän liuokseen lisätään seos, jossa on alaniinimetyyliesterihydrokloridia (15, 0,303 mol), N-metyy-

35

limorfoliinia (16, 0,303 mol) ja DMF:a (200 ml). Syntynyt liuos jäädytetään 10 °C:seen, jolloin lisätään disykloheksyylikarbodi-imidiä (24, 0,265 mol), joka oli metyleenikloridissa (273 ml). Reaktiota seurataan HPLC:n avulla,

5 pitäen reaktiolämpötila 10 °C:ssa, kunnes reaktio on päätynyt. Ellei reaktio oli päättynyt useiden päivien (n. 4) jälkeen, lisätään vielä 24:ää (0,080 mol) ja reaktioseoksen annetaan sekoittua vielä päivä 10 °C:ssa. Reaktiota seurataan edelleen HPLC-analyysin avulla, kunnes se on

10 päättynyt (tavallisesti n. viisi päivää). Kiinteät aineet, jotka muodostuvat reaktion aikana, otetaan talteen tyhjösuo-

15 dattamalla. Suodos väkevöidään sitten jäännökseksi tyhjössä. Syntynyt jäännös otetaan talteen etyyliasetaattiin ja uutetaan pyolikylläisellä Na₂CO₃:n vesiliuoksella (2 x 500 ml). Etyyliasetaattifaasi kuivataan MgSO₄:lla. Syntynyt liuos kirkastetaan ja väkevöidään jäännökseksi tyhjössä.

C. Tetrapeptidifragmentin Ala-His-N^BNal-Ala-OH valmistaminen

Histidyyli-D-beta-naftyyli-alanyyli-alaniinimetyyliesteri, 30.

20

Viisiprosenttista palladioitua hiiltä (3 g) lisätään varovasti liuokseen, jossa on N^B-bentsyylioksikarbonyylihistidyyli-D-beta-naftyyli-alanyyli-alaniinimetyyliesteriä 20 (71 mmol) metanolissa (500 ml) argonatmosfäärissä. Argonin annetaan kuplia reaktioseokseen 15 minuutin ajan ja sitten lisätään etikkahappoa (15 ml, 0,26 mol). Vedyn annetaan kuplia (pinnan alle) syntyneeseen seokseen 15 minuutin ajan ja sitten reaktioseoksen annetaan sekoittua huoneenlämpötilassa vetykerroksen alla (1 atm). HPLC-analyysiä käytetään sitten seurattaessa, kuinka paljon, taiko-

25 ollenkaan, lähtöainetta on jäljellä. Mikäli sitä on jäljellä, argonin annetaan kuplia varovasti reaktioseokseen (pinnan alle 30 minuutin ajan) ja lisätään 5-%:ista palladioitua hiiltä (2,5 g). Sitten johdetaan jälleen vetyä.

30

35 Argonin annetaan taas kuplia reaktioseokseen ja syntynyt

liuos kirkastetaan suodattamalla piimaasuodattimen läpi. Syntynyt liuos väkevöidään tyhjössä, jolloin saadaan tuote. Osa tätä tuotetta liuotetaan tai suspensoidaan veteen (500 ml). Etyyliasettaattia ja kylläistä natriumkarbonaatin vesiliuosta lisätään syntyneeseen aineeseen. Eristämällä etyyliasettaattikerros tai syntyneet kiinteät aineet, saadaan ainetta (30), jossa ei ole asetaattia.

Boc-alaniini-N-hydroksisuksiniimidiesteri, 31.

Disykloheksyylikarbodi-imidiä (43 mmol) lisätään huoneenlämpötilassa olevaan liuokseen, jossa on Boc-alaniinia (43 mmol) ja N-hydroksisuksiniimidiä (48 mmol) metyleenikloridissa (250 ml). Syntyneen liuoksen annetaan sekoitettua yön yli. Reaktioseos suodatetaan sitten disykloheksyyliurean poistamiseksi ja kirkastettu suodos väkevöidään tyhjössä, jolloin saadaan tuote, jota pidetään -20 °C:ssa argonatmosfäärissä ennen käyttöä.

Boc-Ala-His-D-^βNal-Ala-OMe, 32.

Edellä oleva alaniiniesteri (23,9 mmol) lisätään liuokseen, jossa on His-D-^βNal-Ala-OMe:a (30) (20,1 mmol) vedettömässä dimetyyliformamidissa (DMF, 200 ml). Syntyneen homogeenisen liuoksen annetaan sekoittua viikonlopun yli huoneenlämpötilassa ja sitä valvotaan. Kun HPLC-analyysi osoittaa, että reaktioseoksessa ei käytännöllisesti katsoen ole tripepetidiä jäljellä (esim. noin kolme päivää), reaktioseokseen lisätään vettä (50 ml) ja syntyneen seoksen annetaan sekoittua vielä päivä. Tämä liuos väkevöidään sitten tyhjössä. Syntynyt jäännös liuotetaan etyyliasettaattiin ja sitten se uutetaan puolikylläisellä natriumkarbonaatin vesiliuoksella (2 x 300 ml). Orgaaninen faasi kuivataan MgSO₄:lla ja Na₂SO₄:lla ja väkevöidään tyhjössä, jolloin saadaan tetrapeptidi. Tämä aine käytetään ilman lisäpuhdistusta Boc-Ala-His-D-^βNal-Ala-OH:n valmistuksessa.

Boc-Ala-His-D-⁸Nal-Ala-OH, 33.

2-N:inen natriumhydroksidin vesiliuos (7,5 ml, 15 mmol) lisätään metanoli- (500 ml) ja vesiliuokseen (200 ml), jossa on Boc-Ala-His-D-⁸Nal-Ala-OMe:a (13,7 mmol). Kun reaktion on annettu sekoittua yön yli huoneenlämpötilassa, HPLC-analyysi osoittaa, että lähtöainetta on jäljellä. Kun reaktio on pääasiallisesti päättynyt (noin yön yli), syntynyt liuos väkevöidään tyhjössä tilavuuteen, joka on noin 200 ml. Lisätään vettä (100 ml) ja pH säädetään arvoon, joka on noin 12, lisäämällä 2-N:ista natriumhydroksidia (1 ml). Syntynyt liuos uutetaan etyyliasetaatilla (2 x 500 ml). Etyyliasetaattikerrokset heitetään pois. Vesifaasi pH säädetään sitten arvoon, joka on noin 5, lisäämällä HCl:n vesiliuosta, mistä on yleensä seurauksena tuotteen saostuminen. On tärkeää minimoida vesifaasin tilavuus saostumisen edistämiseksi. Vesifaasi dekantoidaan pois tuotteesta ja tuote huuhdellaan sitten vedellä (2 x 50 ml). Eristetty tuote kuivataan vakiopainoonsa tyhjössä.

D. Peptidifragmenttien kondensointireaktio heptapeptidin valmistamiseksi

Boc-Ala-His-D-⁸Nal-Ala-Trp-D-Phe-Lys(Boc)-NH₂, 34.

Kaksi peptidiä, Boc-Ala-His-D-⁸Nal-Ala-OH (33, 2,6 mmol) ja Trp-D-Phe-Lys(Boc)-NH₂ (13, 2,8 mmol) liuotetaan vedettömään DMF:iin ja syntynyt liuos väkevöidään tyhjössä. Tämä alustava väkevöinti suoritetaan tarkoituksena poistaa mahdolliset mukana olevat metanoli-jäämät. Syntynyt peptidiseos liuotetaan uudelleen DMF:iin ja sitten lisätään N-hydroksisuksinimidiä (5,1 mmol). Syntynyt liuos jäähdytetään sitten liuoslämpötilaan, joka on -2 °C, ja sitten lisätään disykloheksyylikarbodi-imidiä (3,4 mmol), joka on liuoksena metyleenikloridissa (3,5 ml). Syntyneen reaktioseoksen annetaan sekoittua -2 °C:n liuoslämpötilassa kolme päivää. HPLC-analyysiä käytetään määrittämään onko reaktio pääasiallisesti päättynyt. Tämän ajan jälkeen, mikä se ei ole päättynyt, voidaan lisätä

disykloheksyylikarbodi-imidiä ja syntyneen reaktioseoksen annetaan sekoittua vielä päivä -2 °C:ssa. Mikäli seuraavana päivänä (yhteensä neljä päivää) HPLC-analyysi osoittaa jälleen, ettei reaktio ole päättynyt, reaktioseoksen jähdytys tulee lopettaa. Reaktion liuoslämpötilaa voidaan hitaasti nostaa huoneenlämpötilaan (25 °C) tuntien aikana (n. 8). Syntyneen reaktioseoksen annetaan sekoittua yön yli huoneenlämpötilassa. Menetelmää toistetaan, kunnes reaktio on päättynyt. Sitten lisätään vettä (50 ml) ja syntyneen reaktioseoksen annetaan sekoittua vielä yksi päivä. Reaktioliuos suodatetaan sitten disykloheksyyliurean poistamiseksi ja syntynyt suodos väkevöidään tyhjössä viskoosiksi öljyksi. Syntyneeseen jäännökseen lisätään etyyliasetaattia ja puolikylläistä natriumkarbonaatin vesiliuosta (200 ml). Kaksifaasisista seosta pyöritetään voimakkaasti pyörivässä haihduttimessa noin yhden tunnin ajan. Kaikki muodostuneet kiinteät aineet otetaan talteen, ja näin saadaan tuote suodattamalla sintterilasisuppilolla. Orgaaninen faasi pestään vedellä ja sitten kuivataan vakiopainoonsa tyhjössä, jolloin saadaan tuote.

Ala-His-D-^BNal-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂, 35.

Heptapeptidi, Boc-Ala-His-D-^BNal-Ala-Trp-D-Phe-Lys-(Boc)-NH₂ (34, 1,02 mmol) lisätään huoneenlämpötilassa olevaa liuokseen, jossa on trifluorietikkahappoa (30 ml), dimetyylisulfidia (14 ml), 1,2-etaaniditiolia (7 ml) ja anisolia (2,2 ml) metyleenikloridissa (15 ml). Homogeenisen reaktioseoksen annetaan sekoittua 15 minuuttia. Tämän jälkeen lisätään vedetöntä eetteriä (450 ml), jolloin saostuu käsittelemätön biologisesti aktiivinen peptidituote 35. Tämä tuote eristetään suodattamalla sintterilasisuppilolla tai dekantoimalla. Syntynyt tuote liuotetaan veteen ja lyofilisoidaan. Lyofilisoitu tuote voidaan edelleen puhdistaa keskipaine-kromaotgrafiolla 26 x 460 mm:n lasikolonilla, joka sisältää LichroperpTM RP-18-kolonnin-pakkausainetta (C-18, 25 - 40 mm, epäsäännöllinen seula).

kun peptidi on injisoitu vedessä olevana liuoksena, kolon-
nia eluoidaan virtausnopeudella, joka on 9 ml minuutissa
alhaisella gradientilla, jossa on 0 - 25 % metanolia, 5 -
20 tunnin ajan, ja sitten gradientilla, jossa on 25 - 55 %
5 metanolia, noin 48 tunnin ajan. Gradientin metanolikon-
sentraatiota nostetaan sitten nopeudella 2 % tunnissa.
Eluoinnin aikana jäljelle jäänyt osa liuotinkoostumusta
koostuu vedestä, joka sisältää 0,2 % trifluorietikkahap-
poa. Tuote (35) identifioidaan HPLC:n avulla ja se eriste-
10 tään väkevöimällä sopivat eluointitilavuudet.

Keksintöä on kuvattu yksityiskohtaisesti viitaten
tiettyihin sen edullisiin suoritusmuotoihin. Asiantuntijat
kuitenkin ymmärtävät, että otettuaan tämän selvityksen
huomioon, he voivat tehdä variaatioita ja muunnelmia kek-
15 sinnön suojapiirin sisällä.

Patenttivaatimukset:

1. Peptidi, jonka kaava on

5 $A_1-A_2-A_3-Trp-A_5-A_6-Z,$

jossa A_1 on His, 3(NMe)His, His-Ala, Ala, Tyr, A_0 -His tai A_0 -3(NMe)His, jossa A_0 on luonnollisesti esiintyvä L-aminohappo, Met(O), DOPA, Abu tai kaavan L- A_0 mukaiset
10 peptidit, jossa L on H, DOPA, Lys, Phe, Tyr, Cys, Tyr-DAla-Phe-Gly, Tyr-DAla-Gly-Phe, Tyr-Ala-Gly-Thr tai Tyr-DAla-Phe-Sar;

A_2 on D^βNal tai DPhe;

A_3 on Ala, Gly tai Ser;

15 A_5 on DPhe, D/L^β(Me)Phe tai (NMe)DPhe;

A_6 on B-G tai G, jossa B on mikä tahansa luonnollisesti esiintyvä L-aminohappo, minkä tahansa luonnollisesti esiintyvän aminohapon dipeptidejä tai $H_2N(CH_2)_nCO_2H$, jossa $n = 2 - 12$ ja G on Arg, iLys, Lys tai Orn;

20 Z on polypeptidin C-pääteryhmä tai C-pääteaminohappo (-happoja) plus loppuryhmä, ja Z on $-CONR^1R^2$, $-COOR^1$, $-CH_2OR^1$, $-Gly-Z'$, $-Met-Z'$, $-Lys-Z'$, $-Cys-Z'$, $-Gly-Tyr-Z'$ tai $-Ala-Tyr-Z'$, jossa Z' on $-CONR^1R^2$, $-COOR^1$ tai $-CH_2OR^1$, jossa R^1 on H, alkyyliryhmä, jossa on 1 - noin 6 hiiliatomia, sykloalkyyliryhmä, jossa on 3 - noin 8 hiiliatomia, alkenyyliryhmä, jossa on 2 - noin 8 hiiliatomia, tai aryyli-
25 ryhmä, jossa on 6 - noin 12 hiiliatomia; R^{12} määritetään kuten R^1 ja ne voivat olla samoja tai erilaisia; jossa aminohappotähteiden lyhenteet ovat IUPAC-IUB-komission biologisen nimistön mukaisia tai sellaisia, joita käytetään tunnetusti biokemiassa; ellei toisin ole mainittu, aminohappo on L-muodossa; kun kolmikirjaamisen aminohappolyhenteen edessä on D-kirjain, aminohappo on D-muodossa; kun sen edessä on D/L, aminohappo on D- ja L-konfiguraatioiden
30 seos;
35

DOPA = 3,4-dihydroksifenyylialaniini, Met(O) = metioniinisulfoksidi, Abu = α -aminovoihappo, iLys = N^ε-isopropyyli-L-lysiini, 4-Abu = 4-aminovoihappo, Orn = L-or-nitiini, D^δNal = α -naftyyli-D-alaniini, D^βNal = β -naftyyli-D-alaniini, Sar = sarkosiini, (Me) = metyyli, (NMe) = N-metyyli;

sekä sen orgaaniset ja epäorgaaniset farmaseuttisesti hyväksyttävät suolat.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen peptidi, t u n -
n e t t u siitä, että A₁ on His. Ala, His-Ala tai A₀-His.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen peptidi, t u n -
n e t t u siitä, että A₃ on Ala.

4. Patenttivaatimuksen 2 mukainen peptidi, t u n -
n e t t u siitä, että A₀ on Ala, Lys tai Glu; A₃ on Ala;
A₆ on Lys, iLys, Ala-Lys, Ala-Ala-Lys tai H₂N(CH₂)_n.CO-Lys,
jossa n' on 4 - 8.

5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen peptidi, t u n -
n e t t u siitä, että sen kaava on His-D^δNal-Ala-Trp-A₆-Z.

7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen peptidi, t u n -
n e t t u siitä, että A₂ on DPhe.

8. Patenttivaatimuksen 6 mukainen peptidi, t u n -
n e t t u siitä, että sen kaava on His-D^δNal-Ala-Trp-DPhe-Lys-NH₂.

9. Patenttivaatimuksen 1 mukainen peptidi, t u n -
n e t t u siitä, että sen kaava on A₀-His-D^δNal-Ala-Trp-DPhe-A₆-Z tai A₀-His-DPhe-Ala-Trp-DPhe-A₆-Z.

10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen peptidi, t u n -
n e t t u siitä, että A₀ on Ala.

11. Patenttivaatimusten 6, 9, 18 tai 20 mukainen peptidi, t u n n e t t u siitä, että Z on -CONH₂.

12. Patenttivaatimuksen 12 mukainen peptidi, t u n -
n e t t u siitä, että sen kaava on

5
 Ala-His-DPhe-Ala-Trp-DPhe-Lys-NH₂,
 Ala-His-D^βNal-Ala-Trp-DPhe-Lys-NH₂,
 Ala-His-D^βNal-Ala-Trp-DPhe-Ala-Lys-NH₂,
 Ala-His-D^βNal-Ala-Trp-DPhe-Ala-Ala-Lys-NH₂,
 Lys-His-D^βNal-Ala-Trp-DPhe-A₆-NH₂, tai
 Glu-His-D^βNal-Ala-Trp-DPhe-A₆-NH₂.

13. Patenttivaatimusten 2, 6, 9, 18 tai 20 mukainen peptidi, t u n n e t t u siitä, että A₆ on G.

10 14. Patenttivaatimuksen 8 mukainen peptidi, t u n n e t t u siitä, että sen kaava on

15
 Ala-His-DPhe-Ala-Trp-DPhe-Ala-Lys-NH₂,
 Ala-His-DPhe-Ala-Trp-DPhe-Ala-Ala-Lys-NH₂,
 Lys-His-DPhe-Ala-Trp-DPhe-A₆-NH₂ tai
 Glu-His-DPhe-Ala-Trp-DPhe-A₆-NH₂.

20 15. Patenttivaatimuksen 1 mukainen peptidi, t u n n e t t u siitä, että sen kaava on His-Ala-D^βNal-Ala-Trp-DPhe-A₆-Z.

16. Patenttivaatimuksen 15 mukainen peptidi, t u n n e t t u siitä, että Z on -CONH₂.

25 17. Patenttivaatimuksen 16 mukainen peptidi, t u n n e t t u siitä, että sen kaava on His-Ala-D^βNal-Ala-Trp-DPhe-Lys-NH₂.

18. Patenttivaatimuksen 1 mukainen peptidi, t u n n e t t u siitä, että sen kaava on His-DPhe-Ala-Trp-DPhe-A₆-Z.

30 19. Patenttivaatimuksen 18 mukainen peptidi, t u n n e t t u siitä, että sen kaava on His-DPhe-Ala-Trp-DPhe-Lys-NH₂.

20. Patenttivaatimuksen 1 mukainen peptidi, t u n n e t t u siitä, että sen kaava on Ala-D^βNal-Ala-Trp-DPhe-A₆-Z tai Ala-DPhe-Ala-Trp-DPhe-A₆-Z.

21. Patenttivaatimuksen 20 mukainen peptidi, t u n n e t t u siitä, että sen kaava on Ala-D⁸nal-Ala-Trp-DPhe-Lys-NH₂ tai Ala-DPhe-Ala-Trp-Dphe-Lys-NH₂.

5 22. Menetelmä, jolla edistetään kasvuhormonitasoja eläimessä, t u n n e t t u siitä, että annetaan eläimelle tehokas määrä vähintään yhtä patenttivaatimusten 1, 4, 5, 7, 9, 12, 14 tai 15 mukaisista peptideistä.

23. Patenttivaatimuksen 22 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että eläin on nisäkäs.

10 24. Patenttivaatimuksen 22 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että eläin on ihminen.

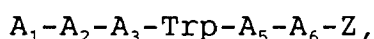
25. Farmaseuttinen koostumus, jolla edistetään kasvuhormonitasojen vapautumista eläimissä, t u n n e t t u siitä, että se käsittää ainakin yhtä patenttivaatimusten 1, 4, 5, 7, 9, 12, 14 tai 15 mukaista peptidiä ja farmaseuttisesti hyväksyttävää kantaja-ainetta tai laimenninta.

26. Patenttivaatimuksen 2 mukainen peptidi, t u n n e t t u siitä, että A₀ on mikä tahansa luonnollisesti esiintyvä aminohappo.

20 27. Menetelmä, jolla edistetään veren kasvuhormonitasojen vapautumista ja kohoamista antamalla patenttivaatimuksen 1 mukaista peptidiä synergistisenä määränä toisen yhdisteen kanssa, t u n n e t t u siitä, että mainittu toinen yhdiste on yhdiste, joka toimii agonistina kasvuhormonia vapauttavan hormonin reseptorissa tai se estää somatostatiinin vapautumisen.

25 28. Patenttivaatimuksen 25 mukaiset farmaseuttiset koostumukset, t u n n e t t u siitä, että ne käsittävät edelleen toisen yhdisteen, joka toimii agonistina kasvuhormonia vapauttavan hormonin reseptorissa tai estää somatostatiinin vapautumisen.

30 29. Seuraavan kaavan mukaisen peptidin käyttö:



jossa A_1 on His, 3(NMe)His, His-Ala, Ala, Tyr, A_0 -His tai A_0 -3(NMe)His, jossa A_0 on mikä tahansa luonnollisesti esiintyvä L-aminohappo, Met(O), DOPA, Abu tai kaavan L- A_0 mukaisia peptidejä, jossa L on H, DOPA, Lys, Phe, Tyr, Cys, Tyr-DAla-Gly-Phe, Tyr-Ala-Gly-Thr tai Tyr-DAla-Phe-Sar;

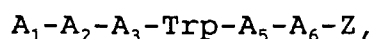
A_2 on D^BNal tai DPhe;

A_3 on Ala, Gly tai Ser;

A_5 on DPhe, D/L^B(Me)Phe tai (NMe)DPhe;

A_6 on B-G tai G, valmistettaessa lääketä, jolla edistetään veren kasvuhormonitasojen vapautumista ja kohouamista.

30. Menetelmä, jolla valmistetaan yhdistettä, jonka kaava on



jossa A_1 on His, 3(NMe)His, His-Ala, Ala, Tyr, A_0 -His tai A_0 -3(NMe)His, jossa A_0 on mikä tahansa luonnollisesti esiintyvä L-aminohappo, Met(O), DOPA, Abu tai kaavan L- A_0 mukaisia peptidejä, jossa L on H, DOPA, Lys, Phe, Tyr, Cys, Tyr-DAla-Gly-Phe, Tyr-Ala-Gly-Thr tai Tyr-DAla-Phe-Sar;

A_2 on D^BNal tai DPhe;

A_3 on Ala, Gly tai Ser;

A_5 on DPhe, D/L^B(Me)Phe tai (NMe)DPhe;

A_6 on B-G tai G, t u n n e t t u siitä, että aminohapot tai aminohappojohdannaiset liitetään yhteen, jolloin muodostuu yhdiste.

31. Menetelmä, jolla valmistetaan patenttivaatimuksen 1 mukaista peptidiä, t u n n e t t u siitä, että se käsittää peptidifragmenttien kondensointireaktion peptidin muodostamiseksi.

Patentkrav:

1. Peptid med formeln

5 $A_1-A_2-A_3-Trip-A_5-A_6-Z$,

vari A_1 är His, 3(NMe)His, His-Ala, Ala, Tyr, A_0 -His eller A_0 -3(NMe)His, vari A_0 är någon i naturen förekommande Aminosyra, Met(O), DOPA, Abu eller peptider med formeln L-
 10 A_0 , vari L är H, DOPA, Lys, Phe, Tyr, Cys, Tyr-DAla-Phe-Gly, Tyr-DAla-Gly-Phe, Tyr-Ala-Gly-Thr eller Tyr-DAla-Phe-Sar;

A_2 är D⁸Nal eller DPhe;

A_3 är Ala, Gly eller Ser;

15 A_5 är DPhe, D/L⁸(Me)Phe eller (NMe)DPhe;

A_6 är B-G eller G, vari B är någon i naturen förekommande aminosyra eller $H_2N(CH_2)_nCO_2H$, vari $n = 2 - 12$, och G är Arg, iLys, Lys eller Orn; Z är C-terminala ändgruppen av polypeptiden eller den eller de C-terminala aminosyrorna plus ändgrupp, och Z är -CONR¹R², -COOR¹, -CH₂OR¹, -Gly-Z', -Met-Z', -Lys-Z', Cys-Z', -Gly-Tyr-Z' eller -Ala-Tyr-Z', vari Z' är -CONR¹R², -COOR¹ eller -CH₂OR¹, vari R
 20 är H, en alkylgrupp med från 1 till ca. 6 kolatomer, en cykloalkylgrupp med från 3 till ca. 8 kolatomer, en alkenylgrupp med från 2 till ca. 8 kolatomer, eller en arylgrupp med från 6 till ca. 12 kolatomer, R² är såsom definierats för R¹ och kan vara lika eller olika; varvid aminosyrarestförkortningarna är i enlighet med dem som rekommenderats av IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature eller i enlighet med dem som sedvanligt används inom
 25 branschen, och då ej annat angivits föreligger aminosyran i L-formen, eller då den av tre bokstäver bestående aminosyraförkortningen föregås av ett D, är aminosyran i D-form och då den föregås av D/L, är aminosyran en blandning av
 30 D- och L-konfigurationerna;

DOPA = 3,4-dihydroxifenylalanin, Met(O) = metionin-sulfoxid, Abu = α -aminosmörtsyra, iLys = N^ε-isopropyl-L-lysin, 4-Abu = 4-aminosmörtsyra, Orn = L-ornitin, D^aNal = α -nafthyl-D-alanin, D^bNal = β -naftyl-D-alanin, Sar = sarkosin, (Me) = metyl, (NMe) = metyl;

jämte dess organiska eller oorganiska, farmaceutiskt godtagbara salter.

2. Peptid enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k - n a d därav, att A₁ är His, Ala, His-Ala eller Ao-His.

10 3. Peptid enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k - n a d därav, att A₃ är Ala.

4. Peptid enligt patentkrav 2, k ä n n e t e c k - n a d därav, att A₀ är Ala, Lys eller Glu; A₃ är Ala; A₆ är Lys, iLys, Ala-Lys, Ala-Ala-Lys eller H₂N(CH₂)_n.CO-Lys, vari
15 n' är 4 - 8.

5. Peptid enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k - n a d därav, att A₂ är D^bNal.

6. Peptid enligt patentkrav 1 med formeln His-D^bNal-Ala-Trp-DPhe-A₆-Z.

20 7. Peptid enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k - n a d därav, att A₂ är DPhe.

8. Peptid enligt patentkrav 6 med formeln His-D^bNal-Ala-Trp-DPhe-Lys-NH₂.

25 9. Peptid enligt patentkrav 1 med formeln A₀-His-D^bNal-Ala-Trp-DPhe-A₆-Z eller A₀-His-DPhe-Ala-Trp-DPhe-A₆-Z.

10. Peptid enligt patentkrav 9, k ä n n e t e c k - n a d därav, att A₀ är Ala.

30 11. Peptid enligt patentkrav 6, 9, 18 eller 20, k ä n n e t e c k n a d därav, att Z är -CONH₂.

12. Peptid enligt patentkrav 12 med formeln

Ala-His-DPhe-Ala-Trp-DPhe-Lys-NH₂,
 Ala-His-D^βNal-Ala-Trp-DPhe-Lys-NH₂,
 5 Ala-His-D^βNal-Ala-Trp-DPhe-Ala-Lys-NH₂,
 Ala-His-D^βNal-Ala-Trp-DPhe-Ala-Ala-Lys-NH₂,
 Lys-His-D^βNal-Ala-Trp-DPhe-A₆-NH₂, eller
 Glu-His-D^βNal-Ala-Trp-DPhe-A₆-NH₂.

10 13. Peptid enligt patentkrav 2, 6, 9, 18 eller 20,
 k ä n n e t e c k n a d därav, att A₆ är G.

14. Peptid enligt patentkrav 8 med formeln

Ala-His-DPhe-Ala-Trp-DPhe-Ala-Lys-NH₂,
 15 Ala-His-DPhe-Ala-Trp-DPhe-Ala-Ala-Lys-NH₂,
 Lys-His-DPhe-Ala-Trp-DPhe-A₆-NH₂ eller
 Glu-His-DPhe-Ala-Trp-DPhe-A₆-NH₂.

15. Peptid enligt patentkrav 1 med formeln His-Ala-
 20 D^βNal-Ala-Trp-DPhe-A₆-Z.

16. Peptid enligt patentkrav 15, k ä n n e -
 t e c k n a d därav, att Z är -CONH₂.

17. Peptid enligt patentkrav 16 med formeln His-
 Ala-D^βNal-Ala-Trp-DPhe-Lys-NH₂.

25 18. Peptid enligt patentkrav 1 med formeln His-
 DPhe-Ala-Trp-DPhe-A₆-Z.

19. Peptid enligt patentkrav 18 med formeln His-
 DPhe-Ala-Trp-DPhe-Lys-NH₂.

20. Peptid enligt patentkrav 1 med formeln Ala-
 30 D^βNal-Ala-Trp-DPhe-A₆-Z eller Ala-DPhe-Ala-Trp-DPhe-A₆-Z.

21. Peptid enligt patentkrav 20 med formeln Ala-
 D^βNal-Ala-Trp-DPhe-Lys-NH₂ eller Ala-DPhe-Ala-Trp-DPhe-Lys-
 NH₂.

22. Förfarande för befrämjande av utlösningssgraden
 35 av tillväxthormon hos ett djur, k ä n n e t e c k n a t

därav, att man åt djuret administrerar en effektiv mängd av åtminstone någon av peptiderna enligt patentkrav 1, 4, 5, 7, 9, 12, 14 eller 15.

23. Förfarande enligt patentkrav 22, k ä n n e -
5 t e c k n a t därav, att djuret är ett däggdjur.

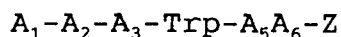
24. Förfarande enligt patentkrav 22, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att djuret är en människa.

25. Farmaceutisk komposition för befrämjande av
10 utlösningssgraden tillväxthormon hos djur, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att det omfattar åtminstone någon av
peptiderna enligt patentkrav 1, 4, 5, 7, 9, 12, 14 eller
15 och en farmaceutiskt godtagbar bärare eller ett dito
utspädningsmedel.

26. Peptid enligt patentkrav 2, k ä n n e t e c k -
15 n a d därav, att A_0 är någon i naturen förekommande amino-
syra.

27. Förfarande för befrämjande av utlösningss- och
ökningsgraden av blodtillväxthormon genom administrering
av peptiden enligt patentkrav 1 i en synergistisk mängd
20 med en annan förening, k ä n n e t e c k n a t därav, att
den andra föreningen är en förening som tjänstgör som en
agonist vid den tillväxthormon utlösande hormonreceptorn
eller som hämmar utlösningen av somatostatin.

29. Användningen av en förening med formeln
25



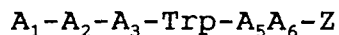
30 vari A_1 är His, 3(NMe)His, His-Ala, Ala, Tyr, A_0 -His
eller A_0 -3(NMe)His, vari A_0 är någon i naturen förekommande
L-aminosyra, Met(O), DOPA, Abu eller peptider med formeln
L- A_0 , vari L är H, DOPA, Lys, Phe, Tyr, Cys, Tyr-DAla-Phe-
Gly, Tyr-DAla-Gly-Phe, Tyr-Ala-Gly-Thr eller Tyr-DAla-Phe-
Sar;

35 A_2 är D^8 Nal eller DPhe;
 A_3 är Ala, Gly eller Ser;

A_5 är DPhe, D/L^B(Me)Phe eller (NMe)DPhe;

A_6 är B-G eller G, vid framställningen av ett läkemedel för befrämjande av utlösning- och ökningsgraden av blodtillväxthormon.

- 5 30. Förfarande för framställning av en förening med formeln



- 10 vari A_1 är His, 3(NMe)His, His-Ala, Ala, Tyr, A_0 -His eller A_0 -3(NMe)His, vari A_0 är någon i naturen förekommande Aminosyra, Met(O), DOPA, Abu eller peptider med formeln L- A_0 , vari L är H, DOPA, Lys, Phe, Tyr, Cys, Tyr-DAla-Phe-Gly, Tyr-DAla-Gly-Phe, Tyr-Ala-Gly-Thr eller Tyr-DAla-Phe-Sar;
- 15

A_2 är D^BNal eller DPhe;

A_3 är Ala, Gly eller Ser;

A_5 är DPhe, D/L^B(Me)Phe eller (NMe)DPhe;

- A_6 är B-G eller G, k ä n n e t e c k n a t därav, att man kopplar aminosyror eller aminosyraderivat för bildande av föreningen.
- 20

31. Förfarande för framställning av peptiden enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att det omfattar en kondensationsreaktion av peptidfragment för bildande av peptiden.

25