



(19) **UA** (11) **79 440** (13) **C2**
 (51)МПК

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
 УКРАИНЫ

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ДЕПАРТАМЕНТ
 ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ УКРАИНЫ

(21), (22) Заявка: 20040504092, 30.10.2002

(24) Дата начала действия патента: 25.06.2007

(30) Приоритет: 31.10.2001 PL P-350463

(46) Дата публикации: 25.06.2007_{A61K} 38/27

20070101CFI20070115RMUA	A61K	38/00
20070101CLN20070115RMUA	A61P	5/02
20070101ALI20070115RMUA	C07K	1/06
20070101ALI20070115RMUA	C07K	1/16
20070101ALI20070115RMUA	C07K	14/60
20070101ALI20070115RMUA		

(86) Заявка PCT:
 PCT/PL2002/000080, 20021030

(72) Изобретатель:

Издебски Ян, PL,
 Кунце Данута, PL,
 Орловска Алисия, PL,
 Витковска Ева, PL,
 Шелевски Веслав, PL,
 Кутнер Анджей, PL,
 Банковски Кжиштоф, PL,
 Фрацкевич Эльзбета, PL

(73) Патентовладелец:

ИНСТИТУТ ФАРМАЦЕВТИЧНЫ, PL,
 ЗАКЛАДЫ ФАРМАЦЕВТИЧНЕ ПОЛЬФАРМА
 С.А., PL

(54) АНАЛОГИ РИЛИЗИНГ-ГОРМОНА ГОРМОНА РОСТА ЧЕЛОВЕКА, СПОСОБ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ,
 ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ И СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ

(57) Реферат:

Изобретение относится к аналогам рилизинг-гормона гормона роста с аминокислотной последовательностью формулы:

Dat-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr¹⁰-R¹¹-R¹²

-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-R²⁰-R²¹

-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Asp-R²⁹-NH₂ (I), в

которой R¹¹ представляет собой hArg, Gab или

Gar; R¹² представляет собой hArg, Orn, Gab или

Gar; R²⁰ представляет собой hArg, Gab или

Gar; R²¹ представляет собой hArg, Gab или Gar;

R²⁹ представляет собой D-Arg, hArg, Gab или Gar;

и их фармацевтически приемлемым солям; способу получения пептидов – аналогов гормона; фармацевтической композиции, содержащей активное вещество, и способу лечения расстройств, вызванных дефицитом гормона роста у человека.

Официальный бюллетень "Промышленная собственность". Книга 1 "Изобретения, полезные модели, топографии интегральных микросхем", 2007, N 9, 25.06.2007. Государственный департамент интеллектуальной собственности Министерства образования и науки Украины.

UA 79440 C2

UA 79440 C2



(19) **UA** (11) **79 440** (13) **C2**
 (51) Int. Cl.

MINISTRY OF EDUCATION AND SCIENCE OF
 UKRAINE

STATE DEPARTMENT OF INTELLECTUAL
 PROPERTY

(12) **DESCRIPTION OF PATENT OF UKRAINE FOR INVENTION**

(21), (22) Application: 20040504092 , 30.10.2002

(24) Effective date for property rights: 25.06.2007

(30) Priority: 31.10.2001 PL P-350463

(46) Publication date: 25.06.2007_{A61K} 38/27

20070101CFI20070115RMUA	A61K	38/00
20070101CLN20070115RMUA	A61P	5/02
20070101ALI20070115RMUA	C07K	1/06
20070101ALI20070115RMUA	C07K	1/16
20070101ALI20070115RMUA	C07K	14/60
20070101ALI20070115RMUA		

(86) PCT application:
 PCT/PL2002/000080, 20021030

(72) Inventor:
 IZDEBSKI JAN, PL,
 KUNCE DANUTA, PL,
 ORLOWSKA ALICJA, PL,
 WITKOWSKA EWA, PL,
 SZELEJEWSKI WIESLAW, PL,
 KUTNER ANDRZEJ, PL,
 BANKOWSKI KRZYSZTOF, PL,
 FRACKIEWICZ ELZBIETA, PL

(73) Proprietor:
 INSTYTUT FARMACEUTYCZNY, PL,
 ZAKLADY FARMACEUTYCZNE POLPHARMA
 S.A., PL

(54) **ANALOGUES OF RELEASING HORMONE OF HUMAN GROWTH HORMONE, METHOD OF PRODUCTION, PHARMACEUTICAL COMPOSITION, AND METHOD FOR TREATMENT**

(57) Abstract:

The invention relates to the analogues of the releasing hormone of growth hormone with the following amino acid sequence:
 Dat-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr¹⁰-R¹¹-R¹²
 -Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-R²⁰-R²¹
 -Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Asp-R²⁹-NH₂ (I),
 wherein R¹¹ is hArg, Gab or Gap; R¹² is hArg, Orn, Gab or Gap; R²⁰ is hArg, Gab or Gap; R²¹ is hArg, Gab or Gap; R²⁹ is D-Arg, hArg, Gab or Gap; and their pharmaceutically acceptable salts; the

methods for producing the peptides – analogues of the hormone; the pharmaceutical formulation containing the active ingredient, and the method for treating the disorders associated with growth hormone deficiency.

Official bulletin "Industrial property". Book 1 "Inventions, utility models, topographies of integrated circuits", 2007, N 9, 25.06.2007. State Department of Intellectual Property of the Ministry of Education and Science of Ukraine.

UA
79440
C2

UA
79440
C2



(19) **UA** (11) **79 440** (13) **C2**
(51)МПК

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ

(12) ОПИС ВИНАХОДУ ДО ПАТЕНТУ УКРАЇНИ

(21), (22) Дані стосовно заявки:
20040504092, 30.10.2002

(24) Дата набуття чинності: 25.06.2007

(30) Дані стосовно пріоритету відповідно до Паризької конвенції : 31.10.2001 PL P-350463

(46) Публікація відомостей про видачу патенту (деклараційного патенту): 25.06.2007_{A61K} 38/27
20070101CFI20070115RMUA A61K 38/00
20070101CLN20070115RMUA A61P 5/02
20070101ALI20070115RMUA C07K 1/06
20070101ALI20070115RMUA C07K 1/16
20070101ALI20070115RMUA C07K 14/60
20070101ALI20070115RMUA

(86) Номер та дата подання міжнародної заявки відповідно до договору РСТ:
PCT/PL2002/000080, 20021030

(72) Винахідник(и):
Іздебські Ян, PL,
Кунце Данута, PL,
Орловська Аліся, PL,
Вітковська Єва, PL,
Шелеєвські Веслав, PL,
Кутнер Анджей, PL,
Банковські Кжиштоф, PL,
Фрацкевич Ельзбета, PL

(73) Власник(и):
ІНСТИТУТ ФАРМАЦЕВТИЧНИ, PL,
ЗАКЛАДИ ФАРМАЦЕВТИЧНЕ ПОЛЬФАРМА
С.А., PL

(54) АНАЛОГИ ГОРМОНУ, ЩО ВИВІЛЬНЮЮТЬ ГОРМОН РОСТУ ЛЮДИНИ, СПОСІБ ЇХ ОДЕРЖАННЯ, ФАРМАЦЕВТИЧНА КОМПОЗИЦІЯ ТА СПОСІБ ЛІКУВАННЯ

(57) Реферат:

Винахід належить до аналогів гормону, що вивільнюють гормон росту, що мають амінокислотну послідовність формули:
Dat-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr¹⁰-R¹¹-R¹²
-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-R²⁰-R²¹
-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Asp-R²⁹-NH₂ (I), в якій R¹¹

є hArg, Gab або Gap; R¹² є hArg, Orn, Gab або Gap; R²⁰ є hArg, Gab або Gap; R²¹ є hArg, Gab або Gap; R²⁹ є D-Arg, hArg, Gab або Gap; і їх фармацевтично прийнятних солей; способу одержання пептидів - аналогів гормону; фармацевтичної композиції, що містить активну речовину, та способу лікування розладів, викликаних дефіцитом гормону росту у людини.

UA 79440 C2

UA 79440 C2

Опис винаходу

Представлений винахід стосується нових пептидів - аналогів гормону, що вивільнює гормон росту людини, способу одержання нових пептидів і їх терапевтичного застосування.

Вивільнення і синтез гормону росту людини (GH, соматотропін) знаходиться під постійним контролем з боку двох взаємно антагоністичних гіпоталамічних гормонів - гормону, що інгібує вивільнення гормону росту (GHI, соматостатин) і гормону, що вивільнює гормон росту. Терапія, що ґрунтується на призначенні гормону, що вивільнює гормон росту людини (hGH-RH), може застосовуватись для більшості пацієнтів з недостатнім рівнем GH. Було встановлено, що його N-термінальний аналог hGH-RH(1-29)-NH₂, який є вкороченим фрагментом, зберігає повну біологічну активність ендогенного hGH-RH, який містить 44 амінокислотні залишки. hGH-RH(1-29)-NH₂ можна одержати за допомогою синтезу; синтетичний GH-RH(1-29)-NH₂ під назвою ацетат сермореліну стверджений для використання при лікуванні дітей маленького зросту і також досліджується можливість його використання при лікуванні розладів нейросекреції, як ад'ювант для гонадотропінвкликаної овуляції у безплідних жінок і для лікування СНІД-залежних катаболітичних розладів.

Однак, описується, що hGH-RH(1-29)-NH₂ є відносно нестійкими до ферментної деградації. Основними метаболітами, що спостерігаються, є характеристичними для розщеплення зв'язку між Arg¹¹-Lys¹² і Lys¹²-Val¹³, що викликається трипсинподібними ферментами [L.A. Frohman, T.R. Downs, E.P. Heimer, A.M. Felix J. Clin. Invest. 1989, 83, 1533-1540]. Нещодавно було встановлено, що при деградації трипсином аналогу hGH-RH(1-29)-NH₂ відбувається гідроліз пептидних зв'язків при карбоксильній групі всіх основних амінокислотних залишків, включаючи C-термінальний амідний зв'язок, в той час як у аналогу, який відрізняється тільки наявністю Orn залишків замість Lys, гідролізують тільки зв'язки сусідні з Arg залишками [E. Witkowska, A. Orfowska, B. Sagan, M. Smoluch, J. Izdebski J. Peptide Sci. 2000, 6 (Suppl.), 189; E. Witkowska, A. Ortowska, B. Sagan, M. Smoluch, J. Izdebski J. Peptide Sci, 2001, 7, 166-172]. Це відкриття узгоджується з надзвичайно високою in vivo активністю аналогів, що містять Orn в положеннях 12 і 21 [J. Izdebski, J. Pinski, J.E. Horwath, G. Halmos, K. Groot, A.V. Serially, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995, 92, 4872-4876].

Були здійснені спроби подолати проблему нестабільності hGH-RH(1-29)-NH₂, inter alia шляхом заміни Arg в положенні 29 амінокислотної послідовності на Argm (4-гуанідилбутиламін) [Bajusz et al., in Peptides 1982, Blaha and Melon, Eds.; W. De Gruyter, Berlin-New York, pp.643-647], або шляхом заміни Tyr в положенні 1 на Dat (дезамінотірозин) і Lys в положенні 12 на D-Lys, Arg або Orn [Міжнародні заявки № WO 94/11396 і WO 94/11397].

Однак, результати цих спроб є незадовільними і все ще існує потреба в аналогах, що поєднують підвищену здатність вивільнювати гормон росту із висоткою стійкістю до ферментної деградації, які б дозволили зменшити дози лікарського засобу і/або зменшити кількість введень.

Винахідниками було встановлено, що введення певних амінокислот у аналог гормону, що вивільнює гормон росту людини, не тільки призводить до аналогів з вищою біологічною активністю - кращою здатністю вивільнювати гормон росту, але також мають корисний вплив на стійкість пептидів до ферментів. Певними амінокислотами є D-Arg в положенні 29, і амінокислоти, що містять гуанідинові групи в їх бічному ланцюзі, в положеннях зайнятих в природному пептиді Lys і Arg.

Нові пептиди - аналоги гормону, що вивільнює гормон росту, згідно з винаходом мають амінокислотну послідовність формули (I):



в якій:

R¹¹ є hArg, Gab або Gap;

R¹² є hArg, Orn, Gab або Gap;

R²⁰ є hArg, Gab або Gap;

R²¹ є hArg, Orn, Gab або Gap;

R²⁹ є D-Arg, hArg, Gab або Gap.

Нові пептиди є сильними і селективними стимуляторами вивільнення гормону росту і вони мають високу резистентність до дії ферментів.

Нові пептиди або їх фармацевтично прийнятна сіль можуть бути введенні пацієнтові індивідуально або як активний інгредієнт фармацевтичних композицій.

Таким чином, представлений винахід також стосується фармацевтичної композиції, що містить, принаймні, один з нових аналогів гормону, що вивільнює гормон росту, який має амінокислотну послідовність формули (I):



в якій:

R¹¹ є hArg, Gab або Gap;

R¹² є hArg, Orn, Gab або Gap;

R²⁰ є hArg, Gab або Gap;

R²¹ є hArg, Orn, Gab або Gap;

R²⁹ є D-Arg, nArg, Gab або Gap.

або його фармацевтично прийнятну сіль і, принаймні, один носій і/або екціпієнт.

Нові пептиди є корисними для попередження і лікування розладів обумовлених дефіцитом hGH-RH.

Представлений винахід також забезпечує спосіб лікування розладу обумовленого дефіцитом гормону росту людини, що включає введення пацієнтові, що потребує лікування, терапевтично ефективної дози пептиду - аналогу hGH-RH формули (I), де R¹¹, R¹², R²⁰, R²¹ і R²⁹ с такими як описано вище.

Нові пептиди - аналоги гормону, що вивільнює гормон росту, мають амінокислотну послідовність формули (I):



в якій:

R¹¹ є hArg, Gab або Gap;

R¹² є hArg, Orn, Gab або Gap;

R²⁰ є hArg, Gab або Gap;

R²¹ є hArg, Orn, Gab або Gap;

R²⁹ є D-Arg, hArg, Gab або Gap.

Переважаючими пептидами цього винаходу є:

(1)

Dat-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr¹⁰-hArg-hArg-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-hArg²⁰-hArg-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Asp-hArg²⁹-NH₂;

(2)

Dat-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr¹⁰-hArg-Orn-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-hArg²⁰-Orn-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Asp-hArg²⁹-NH₂;

(3)

Gat-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr¹⁰-Gab-Gab-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-Gab-Gab-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Asp-Gab-NH₂;

(4)

Dat-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr¹⁰-hArg-Gab-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-Gab-Gab-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Asp-Gab-NH₂;

(5)

Dat-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr¹⁰-Gab-hArg-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-hArg-hArg-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Asp-D-Arg-NH₂;

(6)

Dat-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr¹⁰-hArg-Gab-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-hArg-hArg-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Asp-D-Arg-NH₂;

(7)

Dat-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr¹⁰-Gap-Gap-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-Gap-Gap-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Asp-Gap-NH₂;

(8)

Dat-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr¹⁰-Gap-Gap-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-hArg-Gap-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Asp-Gap-NH₂.

Пептидами особливо переважними з огляду на біологічну активність і стійкість до дії ферментів травлення є:

Dat-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr¹⁰-hArg-hArg-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-hArg²⁰-hArg-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Asp-hArg²⁹-NH₂, і

Dat-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr¹⁰-hArg-Orn-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-hArg²⁰-Orn-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Asp-hArg²⁹-NH₂.

Нові пептиди корисні для попередження і терапії розладів обумовлених дією гормону, що вивільнює гормон росту людини, і тому вони можуть бути використані для лікування маленького зросту у дітей вікозалежних розладів, для збільшення лінійної ваги тіла і вмісту мінеральних речовин в кістках, при загоєнні ран, для лікування опіків шкіри і переломів кісток, як не стероїдний анаболік при слабкості обумовленій хронічним захворюванням, а також в діагностиці.

Згідно з способом представленого винаходу, при лікуванні розладів обумовлених дією гормону, що вивільнює гормон росту людини, пацієнтові, що потребує такого лікування вводять терапевтично ефективну кількість пептиду - аналогу hGH-RH, що має амінокислотну послідовність (I).

Рівні дозування і режим залежить від виду захворювання, віку пацієнта, ваги і стану, і можуть бути визначені спеціалістом, виходячи з відомих терапевтичних і профілактичних способів лікування дефіциту гормону, що вивільнює гормон росту людини. При лікуванні захворювань цього виду, придатна одиниця дозування аналогу hGH-RH зазвичай становить від 0,01 до 2мкг на кілограм ваги тіла на дозу. Придатна добова доза може бути введена пацієнтові у вигляді однієї або декількох одиничних доз на день, за винятком форм з контрольованим вивільненням, таких як депо або імплантати. Форми з контрольованим вивільненням вводяться через кожні 15 днів або 30 днів, або один раз на три місяці.

Петити представленого винаходу корисно вводити пацієнтові у будь-якій придатній фармацевтичній формі,

будь-яким придатним шляхом, таким як внутрішньовенний, підшкірний, внутрішньом'язовий, пероральний, інтраназальний або пульмонарна інгаляція.

Нові пептиди можуть бути введені окремо або, необов'язково, в комбінації з іншими терапевтичними агентами, що використовуються при лікуванні розладів обумовлених дефіцитом гормону, що вивільнює гормон росту людини, при умові, що вони не спричиняють негативного впливу на дію один одного. Такі сполуки можуть бути введені одночасно як одна рецептура, або у вигляді окремих рецептур або одна після одної, у відповідності із інтервалами, що визначає спеціаліст. Лікаряв відомо, які лікарські засоби і комбінації вибрати.

Фармацевтичні агенти представленого винаходу містять, принаймні, одну активну речовину, яка є пептидом - аналогом hGH-RH, що має амінокислотну послідовність формули I, або її фармацевтично прийнятну сіль і, принаймні, один носій і/або екіпієнт.

Фармацевтичні рецептури представленого винаходу можуть бути одержані у вигляді різних фармацевтичних форм, добре відомих спеціалісту в цій галузі, таких як, наприклад з [Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Mack Publishing Company, 1990].

Фармацевтичними рецептурами придатними для ін'єктування і вливання є стерильні водні, водо-органічні і неводні розчини, суспензії, сухі речовини і таблетки для одержання розчину і імплантати. Носії, що використовуються для одержання суспензій, гарантують рівномірне розподілення активного інгредієнту в рідкій фазі і ними є полісорбати, лецитин, ПЕГ-співполімери поліпропіленгліколю, пептизатори, такі як фосфорани, поліфосфорани і цитрати водорозчинних полімерів, таких як карбоксиметилцелюлоза, метилцелюлоза, полівінілпіролідон, камеді або желатин. Рецептури для ін'єктування можуть містити фармацевтично прийнятні носії або екіпієнти, такі як регулятори рН, буфери тоніки і консерванти. Сухі речовини використовуються для одержання розчинів або непідготовлених суспензій шляхом розведення придатним розчинником.

Для зручності пацієнта і для того щоб досягти прийнятних характеристик вивільнення речовини, похідне пептиду зазвичай вводять у вигляді рецептур для ін'єкції з контрольованим вивільненням і пролонгованою дією, таких як кристалічні полімерні мікрокапсули, що містять активну речовину. Іншим прикладом часозалежної рецептури є імплантат на основі полімеру одержаний шляхом розчинення біодефадуючого полімеру і пептидів цього винаходу у водозмішуваному розчиннику з утворенням рідкої композиції. Коли ін'єктується, полімер утворює депо, з якої активна речовина повільно вивільнюється.

Фармацевтичними формами придатними для введення пероральним шляхом є таблетки, пігулки, порошки, гранули, драже або капсули, що містять фармацевтично прийнятні тверді носії, такі як кукурудзяний крохмаль, лактоза, цукроза, сорбіт, водний силікат мамію, стеаринова кислота, стеарат магнію, гідрофосфат кальцію або камеді. Таблетки або гранули можуть мати покриття або бути оброблені іншим чином для одержання одиниці дозування, що гарантує переважний час вивільнення. Для формування таких захисних шарів або покриттів може бути використаний ряд різних речовин, включаючи полімерні кислоти і суміші полімерних кислот з іншими речовинами, такими як шелак, цетиловий спирт або ацетатцелюлози.

Фармацевтична рецептура, що містить пептид як активну речовину, також може зустрічатись у придатних для введення як аерозолі або порошки для інгаляції. Типова аерозольна рецептура, окрім водного розчину активної речовини, може містити буфери, ізотонічні речовини, консерванти і, необов'язково, інші екіпієнти, що роблять можливим введення активної речовини за допомогою дозованого розпилювача або крапельниці.

Нові пептиди представленого винаходу можуть бути одержані середнім спеціалістом в цій галузі, що знає методику хімічного синтезу, такі як класичний синтез у розчині або твердофазний синтез.

В способі синтезу у розчині, придатно захищені термінальні $N\alpha$ -амінопохідні амінокислот з захищеними бічними ланцюгами (якщо присутні реакційні бічні ланцюги) або фрагменти пептиду конденсують з прийнятно захищеними карбоксильними похідними амінокислот або фрагменти пептидів, α -амінофункцію зазвичай захищають у формі карбамату, такого як кислотонестійка трет-бутоксикарбонільна група (Boc), бензилоксикарбонільна група (Z, CBz) або їх заміщені аналоги, або у формі 9-флуоренілметоксикарбонільної (Fmoc) захисної групи, які є не стійкими в основному середовищі. Карбоксильні групи можуть бути захищені як естер, наприклад, метиловий естер, який є нестабільним в присутності нуклеофільних основ, трет-бутиловий естер, який є нестабільним в кислому середовищі або бензиловий естер, який є нестабільним за гідрогенолітичних умов. Карбоксильні групи в захищеній структурі активуються за допомогою азиду, змішаного ангідриду, активованого естеру, з використанням фосфонієвої або уронієвої кислоти або шляхом використання карбодіімідного способу, використовуючи сполуки, які каталізують реакцію, що викликає рацемізацію, таку як N-гідроксисукцинімід, 1-гідроксибензогріазол, 1-гідрокси-7-азабензотриазол або 3-гідрокси-4-оксо-3,4-дигідро-1,2,3-бензотриазин. Способи конденсування і захисні групи, що зазвичай використовуються в хімії пептидів, описані в [Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, Vol 3, E. Gross, J. Melenofner, Eds (Academic Press, New York, 1981) і Protective Groups in Organic Synthesis, Second Edition (Wiley, New York, 1991)].

В твердофазному синтезі пептидів (ГФСП) запропонованому [Merrifield (J. Am. Chem. Soc. 85 (1963), 2149)] використовують нерозчинний в реакційному середовищі полімерний носій, що містить функціональну групу, до якої може бути приєднана перша амінокислота. Полімерна матриця використовується як перманентна C-термінальна захисна група. Синтез розпочинають з приєднання першої $N\alpha$ -захисної амінокислоти до лінкерної групи. Після зняття захисту з аміногрупи додають іншу активовану захищену амінокислоту. Ланцюгове подовження здійснюють шляхом послідовних стадій зняття захисту і конденсування. В кінці кінців, N-термінальний вільний пептид відщеплюють від смоли з супровідним зняттям захисту функціональних груп бічних ланцюгів. Нерозчинний носій легко відфільтровується з розчину пептиду. Полімерами придатними як носій є, наприклад, целюлоза, полі вініловий спирт, поліметакрилати, співполімер

хлорметильований дивинілбензол-полістерол, 4-метилбенгідриламінова смола (МБГА смола), бензгідриламінова смола (БГА) і їм подібні. Синтез пептидів на полімерному носії проводять в розчинниках, які розчиняють амінокислотні похідні, що використовуються, і є нейтральними за умов проведення реакції. Переважними є розчинники, які додатково добре набухають, такі як диметилформамід, дихлорметан, N-метил-2-піролідон, ацетонітрил, диметилсульфоксид і їх суміші. Після відщеплення амінокислоти від полімерного носія, очищають, наприклад використовуючи вискоєфективну рідинну хроматографію.

Нові пептиди - аналоги GH-RH представленого винаходу, що містять гуанідинову групу в бічних ланцюгах амінокислот переважно одержують використовуючи твердофазний синтез, шляхом введення придатних похідних лізину, 2,4-діаміномасляної кислоти або 2,3-діамінопропіонової кислоти в прийнятні положення ланцюга пептиду приєднаного до полімерного носія, зняття захисту з аміногруп бічного ланцюга і взаємодії вільних аміногруп з гуанідинувальним агентом, видалення всіх т-бутилоксикарбонільних захисних груп, що залишились, і відщеплення синтезованого пептиду від носія, з наступним очищенням і, необов'язково, перетворенням пептиду у фармацевтично прийнятну сіль

Реакцію гуанідинування проводять, використовуючи надлишок гуанідинувального агенту, такого як N,N'-біс(трет-бутилоксикарбоніл)-S-метилізотіосечовина, в присутності промотору реакції, такого як 4-(диметиламіно)піридин.

Синтезовані пептиди очищають, переважно за допомогою вискоєфективної рідинної хроматографії, для досягнення високого ступеня чистоти придатного для фармацевтичного використання.

Нові пептиди можуть бути виділені з реакційної суміші у формі фармацевтично прийнятних солей з різними неорганічними і органічними кислотами і основами. Нові пептиди можуть утворювати фармацевтично прийнятні солі з неорганічними кислотами, такі як: хлорводнева кислота, бромводнева кислота, сірчана кислота, азотна кислота, фосфорна кислота або органічні кислоти, такі як оцтова, пропіонова, малеїнова, фумарова, малінова, бурштинова, винна, лимона, аскорбінова, яблучна, щавлева, корична, манделова, бензойна, метансульфонова, етансульфонова, п-толуолсульфонова кислота і інші кислоти.

Солі також можна одержати з допомогою реакції карбоксильної групи пептиду з лужними металами, гідроксидами і алкоксидами лужних металів, також як і з органічними основами, такими як триметиламін, діетиламін, етаноламіє, піперидин, холін і їм подібні.

Солі можна одержати за допомогою відомих методів, шляхом взаємодії речовини з вільною основою або кислотою з од ним або більшою кількістю еквівалентів придатної основи або кислоти, відповідно, в розчиннику або в середовищі, в якому сіль не розчиняється.

Солі оцтової кислоти нових пептидів - аналогів hGH-RH є переважними втіленнями представленого винаходу. Визначення біологічної активності

Для того щоб визначити біологічну активність нових пептидів представленого винаходу, досліджували їх вплив на рівень в плазмі у щурів гормону росту і інших гіпофізарних гормонів і порівнювали з впливом hGH-RH(1-29)NH₂, як речовини порівняння.

Досліджуваними матеріалами були: hGH-RH(1-29)NH₂ одержували від Sigma Chemical Co., і пептиди - аналогів hGH-RH синтезовані за способом представленого винаходу.

Самиць щурів Вістар (240-260г) розміщали в контрольованому світловому режимі з 14г світла, 10г темноти і забезпечували вільний доступ до їжі і води. Тварин випадково розбивали на експериментальні групи, яким вводили салін (0,9% NaCl; 0,3мл), hGH-RH(1-29)NH₂ в дозі 50 або 150мкг/кг ваги тіла, і пептиди представленого винаходу в дозі 1 або 3мкг/кг ваги тіла. Щури одержували підшкірну (пш.) ін'єкцію пептиду порівняння або кожного з нових тестованих аналогів, розчинених в 0,3мл саліну.

В день експерименту, щурів анестезіювали за допомогою внутрішньочеревної ін'єкції кетаміну (120мг/кг) і шийну вену канюлювали для відбору крові. Через тридцять хвилин, пш вводили сполуки, що досліджуються. Щурам контрольної групи ін'єктували тільки салін. Кров (приблизно 0,6мл) відбирали з шийної вени на 1 хвилині (зразок "0") до, і 15- і 30-хвилинах після пш введення тестуємих сполук. Еквівалентний об'єм гепаринізованого саліну (10IU/мл) вводили до кожного видаленому зразку. В кінці експерименту, тварин умертвляли шляхом анестезіювання надмірною дозою кетаміну. Зразки крові центрифугували і відокремлювали зразки, плазми (приблизно 0,3мл) і зберігали при -20°C, до дослідження за допомогою RIA методів.

Визначали концентрації в плазмі гормону росту, пролактину, лютеїнізуючий гормон, фолікулостимулюючий гормон і тіротролін (GH, PRL, LH, FSH і TSH) для 0,05мл аліквот зразків плазми, використовуючи набори, що поставляються Biotrak (Amersham Life Science, England). Чутливість для щурів GH, PRL, LH, FSH і TSH була 0,16, 0,08, 0,08, 0,09 і 0,05нг/пробірку, відповідно.

Статистичний аналіз результатів проводили використовуючи Statsoft Statistica PL для Windows. Спочатку, всі групи даних досліджували на нормальність за допомогою теста Колмогоров-Смірнов і теста Шапір-Вілка. Визначали статистичні відмінності між групами за допомогою одностороннього ANOVA. Багатократні дослідження інтервалу Дункана використовувались для проведення наступних порівнянь. Однак, коли знаходили розбіжності із значною гетерогенністю, проводили порівняння між групами за допомогою непараметричного аналізу розходжень Крускал-Валліса на Ранк.

Індивідуальні відміни у рівнях гормонів усували шляхом коригування рівня гормону, розраховуючи сільову концентрацію гормону для кожного щура. Цю сільову концентрацію для кожного гормону розраховували як різницю між концентрацією на 15 хвилині після введення сполуки і концентрацією гормону до введення сполуки (Δ 15-0), і різницю між концентрацією гормону на 15 хвилині і 30 хвилині після введення сполуки (Δ 15-30).

Вплив сполук на вивільнення GH визначали шляхом порівняння значення сільової концентрації GH (Δ 15-0) після ін'єктування hGH-RH-(1-29)NH₂ в дозах 50,0мкг і 150,0мкг на кг ваги тіла, і 1,0мкг і 3,0мкг для

аналогів, на кг ваги тіла. Результати для вибраної сполуки (1) представлені в Таблицях 1 і 2. Значні відміни між оброблюваними групами визначали за допомогою модифікованого Ліпліетором тесту Крускал-Валліса.

5

Таблиця 1					
Дія підшкірного введення hGH-RH пептидів і їх аналогів на вивільнення GH у самиць щурів.					
Сполука	Доза [мкг/кг]	Кількість щурів	Кількість GH в плазмі в різний час після введення [нг/кг]		
			0хв	15хв	30хв
Салін	50	11	21,4±2,9	19,8±3,9	17,8±2,7
hGH-RH(1-29)-NH ₂	50	11	24,5±2,7	79,1±7,9*	39,0±5,9*
	150	11	27,1±3,2	163±18"	103±15**
Сполука 1	1	9	23,1±2,0	99,1±16**	42,5±9,2*
	3	9	28,3±4,1	130±16**	58,4±8,9**

Результати виражали як значення ± СПЗ (стандартна похибка значення)

* P<0,01 до контрольного саліну

** P<0,001 до контрольного саліну

10

15

20

Таблиця 2				
Зміна концентрації GH після підшкірного введення аналогів hGH-RH				
Сполука	Доза [мкг/кг]	Кількість щурів	Сітвоя концентрація GH в різний час після ін'єктування [нг/мл]	
			Δ(15-0)#	Δ(15-30)#
Салін	50	11	-1,59±1,5	1,97±1,5
hGH-RH(1-29)-NH ₂	50	11	54,6±7,9**	40,1±6,7**
	150	11	135±16,9**	59,9±16,6**
Сполука 1	1	9	75,9±16,0**	56,5±14,7**
	3	9	102±12,6**	72,0±12,6*

Результати виражали як значення DGH [нг/мл].

Зміни в плазмі GH (AGH) виражали як сітвову концентрацію GH і розраховували для кожного щура.

Δ(15-0) розраховували як різницю між концентрацією GH на 15хв після введення тестованої сполуки і концентрацією GH до введення сполуки ("0хв"). Δ(15-30) розраховували як різницю між концентрацією GH на 15хв після введення тестованої сполуки і концентрацією GH на 30хв після введення сполуки.

** P < 0,001 до контрольного саліну.

25

30

35

Одержані результати вказують, що тестовані аналоги hGH-RH проявляють стимулюючу дію на вивільнення GH у щурів, порівняно з контрольним саліном. Саму сильну стимулюючу дію проявляє сполука позначена як (1). Максимальний стимулюючий ефект спостерігається через 15 хвилин після її введення. Цей ефект спостерігається протягом 30 хвилин після введення. Вплив сполуки 1 на сітвову концентрацію GH був співставимий з сітвовой концентрацією цього гормону на 15 хвилині після ін'єктування hGH-RH-(1-29)-NH₂ в дозі в 50 разів вищій. Відносна ефективність сполуки 1 ґрунтується на дозах 1,0 і 3,0мкг і дозах 50 і 150мкг hGH-RH-(1-29)-NH₂ на кг ваги тіла. Відносна ефективність цього нового аналогу була в 70 і 38 разів вищою, відповідно, порівняно з hGH-RH-(1-29)-NH₂ на 15 хвилині після ін'єктування.

40

45

Під час цього дослідження також було встановлено, що нові сполуки представленого винаходу діють селективно і вони не впливають на рівні концентрації в крові інших гіпофізарних гормонів - пролактин, лутропін, фоллітропін і тиреотропін, в периферичні крові щурів.

Одержані сполуки також досліджували на стійкість до дії ферментів в тесті з трипсином.

50

Зразок пептиду (1,2мг) розчиняли в рН 8,5 буфері (2,9мл; 0,05М розчину ацетату амонію) і інкубували при 37°C протягом 20 хвилин. Потім, додавали розчин трипсину (100мкл; 0,02мг/мл; Serva, 360/мг). Одержаний розчин інкубували при 37°C протягом 60 хвилин. Відбирали аліквоту (500мкл) і розводили 0,5М оцтової кислоти (1мл), потім ліофілізували. Одержаний матеріал аналізували за допомогою ВЕРХ, використовуючи систему Кнауера з колонкою Eurospher 100 C18 (4,6x250мм, 5 мікрон). Використовували наступну систему розчинників: А, 0,1% ТФО у воді; В, 80% розчин ацетонітрилу в А; з лінійним градієнтом 25-70% В; швидкість потоку 1мл/хвилину; детектування проводили при 220 нанометрах. Результати дигерування пептиду зведені в Таблиці 3.

55

60

Таблиця 3		
Дигерування трипсином аналогів RH-GH		
Сполука №	Час дигерування [хв]	% Незміненої сполуки
1	30	>99
	60	>99
2	30	>99
	60	>99

65

5	3	30	86
		60	72
10	4	30	82
		60	67
15	5	30	80
		60	51
20	6	30	85
		60	73
25	7	30	75
		60	68
30	8	30	>99
		60	>99
35	Еталон*	30	0
		60	0

* 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-Ile-Ser-Arg-NH₂ (hGH-RH(1-29)-NH₂)

Результати приведені в Таблиці 3 вказують, що всі досліджені нові аналоги hGH-RH мають набагато більшу стійкість до дигерування трипсином порівняно з стандартом, hGH-RH(1-29)-NH₂. Таким чином, через 30 хвилин, за умов що забезпечують повне дигерування пептиду, інші пептиди залишаються або незмінними [пептид (1), (2) і (8)], або зазнають тільки незначного гідролізу.

Нові пептиди представленого винаходу характеризуються високою активністю по вивільненню гормону росту, вони діють селективно і не впливають на рівні інших гіпофізарних гормонів - пролактин, лутропін, фоллітропін і тиреотропін. Особливо переважний пептид має амінокислоту послідовність Dat-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-hArg-hAfg-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-hArg-hArg-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Ile-NI e-Asp-hArg-NH₂, і він має набагато сильну дію по вивільненню гормону росту порівняно з еталонним пептидом hGH-RH(1-29)-NH₂, і таким чином зберігає максимальну стимулюючу дію через 15 хвилин. Одночасно, нові сполуки цього винаходу проявляють набагато вищу стійкість до дії дигеруючих ферментів порівняно з відомими синтетичними аналогами hGH-RH, що робить нові сполуки особливо корисними для використання при виготовленні фармацевтичних агентів, що використовуються в лікуванні і попередженні розладів обумовлених нестачею гормону росту.

Визначення і умовні позначення

Визначення і пояснення нижче є термінами як використовують у всьому цьому документі включаючи опис і формулу винаходу.

Визначення

Номенклатура амінокислот і аббревіатури використовують тут у відповідності з загально прийнятними правилами IUPAC-IUB, наприклад, [R.M. Schultz, M.N. Liebman Proteins: Composition and Structure, Chapter 2, in: Textbook of Biochemistry, 3rd Edition, T.M. Devlin, Ed.; Wiley-Liss, New York, 1992; і European J. Biochem. 738(1984), 9-37]. Трилітерні аббревіатури, що тут використовуються, мають наступні значення:

Ala = аланін

Arg = аргінін

hArg = гомоаргінін (6-гуанідин-2-капронова кислота)

Asn = аспарагін

Asp = аспарагінова кислота

Dat = дезамінотірозин, 3-(4'-гідроксифеніл)пропіонова кислота

Gln = глутамін

Gab = 4-гуанідин-2-аміномасляна кислота

Gap = 3-гуанідин-2-амінопропіонова кислота

Ily = ізолейцин

Leu = лейцин

Lys = лізин

Me = норлейцин

Orn = орнітин

Phe = фенілаланін

Ser = серин

Thr = треонін

Tyr = тірозин

Val = валін

Всі послідовності пептидів приведені в даному описі, в прикладах і в пунктах формули написані за стандартними правилами згідно з якими послідовність починається з N-термінальної амінокислоти і закінчується C-термінальною амінокислотою. Амінокислоти знаходяться в L конфігурації, якщо не вказано інше.

Представлений винахід зараз описується з посиланням на наступні специфічні необмежуючі приклади.

Приклади

Загальна методика синтезу пептиду

А. Утворення пептичного ланцюга

Для захисту α -аміно функціональних груп використовували т-бутилоксикарбонільну (Boc) групу; бічні ланцюги захищали наступними групами: Asp - циклогексиллом; Orn - бензилоксикарбонілом; Ser і Thr - бензилом; Tug - 2-бромбензилоксикарбонілом.

Для того щоб одержати аналоги, що містять залишок hArg, залишки лізину у формі Boc-Lys(Fmoc) похідного вводили в прийнятні положення в пептидному ланцюзі.

Для того щоб одержати аналоги, що містять залишки Gab і/або Gap, 2,4-залишки діаміномасляної кислоти і залишки 2,3-діамінопропіонової кислоти вводили а прийнятні положення, у формі Boc-Dab(Fmoc) і Boc-Dap(Fmoc) похідних, відповідно.

Для того щоб одержати аналоги, що містять залишки Orn, Boc-Orn(Z) похідне вводили під час синтезу прийнятних положень пептидного ланцюга.

МБГА смолу (4-метилбензгідриламінова смола, Bachem California або Novabiochem, пр. 0,5мек./г), після розбухання в дихлорметані (ДХМ) протягом 30 хвилин, обробляли 5% діізопропілетиламіновим (ДІЕА) розчином ДХМ (1×1хв., 1×20хв.) і промивали ДХМ (6×1хв.).

Захищені пептидильні смоли синтезували використовуючи стандартні методики на кожній стадії синтезу, згідно з наступним протоколом:

(а) Видалення Boc групи 55% розчином трифтороцтової кислоти (ТФО) в ДХМ (1×1хв., 1×20хв.);

(б) Промивання ДХМ (3×1хв.);

(в) Промивання 30% розчином 1,4-діоксан/ДХМ (2×1хв.);

(г) Промивання ДХМ (3×1хв.);

(д) Нейтралізація 5 % ДІЕА/ДХМ (1×1хв., 1×5хв.);

(е) Промивання ДХМ (6×1хв.);

(ж) Конденсування Boc-амінокислоти (1,2ммоль) за допомогою карбодіімідного способу, використовуючи N,N'-діізопропілкарбодіімід (ДІК), 1,2ммоль, в ДХМ, час реакції: 2 години. У випадку Boc-Gln і Boc-Asn, N-гідроксибензотриазол (НОВт), 1,2ммоль, додавали до реакційної суміші;

(з) Промивання ДХМ (6×1хв.).

Б. Введення гуанідинових груп

Для того щоб видалити Fmoc групу з Lys залишку, захищену пептидильну смолу обробляли розчином 50% піперидин/ДМФА (1×10хв., 1×2г), потім смолу промивали диметилформамідом (ДМФА) (3×1хв.), розчином 50% ДМФА/ДХМ (3×2хв.), розчином 50% метанол/ДХМ і ДХМ (3×2хв.). Пептидильну смолу піддавали взаємодії з N,N'-біс(трет-бутилоксикарбоніл)-S-метилізотіосечовиною (п'ятикратним молярним надлишком) в присутності 4-(диметиламіно)піридину (70мг) в ДМФА, протягом 4 днів. Одержану пептидильну смолу промивали ДМФА (3×1хв.), і ДХМ (3×1хв.), Boc групи видалляли розчином 55% ТФО/ДХМ (1×1хв., 1×20хв., 1×40хв.), з наступним промиванням ДХМ (3×1хв.), 50 % ДМФА/ДХМ (2×1хв.) і ДХМ (2×1хв.).

В. Відщеплення пептиду від смоли

Пептидильну смолу обробляли рідким фторидом водню (HF), в присутності анізолу. Реакцію проводили протягом 1 при 0°C. Надалі, HF видаляли при пониженому тиску, залишок промивали холодним діетиловим етером і екстрагували 50% розчином оцтової кислоти, потім ліофілізували.

Г. Очищення пептиду

Неочищені пептиди очищали за допомогою вискоефективної рідинної хроматографії, використовуючи систему Кнауера з колонкою Вертекс, Nucleosil-300 C18 (8×200мм, 5 мікрон). Використовували наступні системи розчинників: А, 0,1% розчин ТФО у воді; Б, 80% розчин MeCN в А. Елюювання проводили з градієнтом 20-55 % Б протягом 30 хвилин, потім ізократично 55% Б протягом 30 хвилин, із швидкістю потоку 2мл/хвилину. Фракції аналізували з колонки Вертекс, Nucleosil 100 C18 (4×250мм, 5 мікрон), проганяли з градієнтом 25-70% протягом 30хв.; швидкість потоку: 1 мл/хв. Детектування проводили при 220нм. Гомогенні фракції (один пік на хроматограмі) об'єднували, розводили водою і ліофілізували одержуючи хроматографічно чистий продукт. Структури пептидів визначали з ESI-MS масспектру на спектрометрі Finnigan MAT 95S (Bremen, Germany).

Приклад 1

Одержання

Dat-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-hArg-hArg-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-hArg-hArg-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-NI e-Asp-hArg-NH₂ [Сполука (1)]

3,1г МБГА смоли (4-метилбензгідриламінової смоли, Novabiochem, 0,49мек./г), після приєднання придатнозахищених похідних амінокислот згідно з приведеною вище загальною методикою синтезу пептиду (розділ А), одержували повністю захищену пептидильну смолу: Dat-Ala-Asp(OcHex)-Ala-Ile-Phe-Thr(OBzl)-Asn-Ser(OBzl)-Tyr(2-Br-Z)-Lys(Fmoc)-Lys(Fmoc)-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-Lys(Fmoc)-Lys(Fmoc)-Leu-Leu-Gln-Asp(OcHex)-Ile-NIe-Asp(OcHex)-Lys(Fmoc)-смола.

Наступна методика, згідно із згаданою вище загальною методикою синтезу пептиду (розділ Б), після видалення всіх Fmoc захисних груп і вичерпного гуанідинування, з наступним видаленням всіх Boc груп, одержували 9,53г пептидильної смоли Dat-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-hArg-hArg-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-hArg-hArg-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-NI e-Asp-hArg-NH₂-смола.

Цю смолу піддавали дії рідкого фториду водню (200мл HF), в присутності анізолу (15мл), згідно з приведеною вище загальною методикою синтезу пептиду (розділ В), що давало 4,5г неочищеного пептиду 50% чистоти, виходячи з ВЕРХ аналізу.

Неочищений пептид (20мг зразка) очищали за допомогою вискоефективної рідинної хроматографії, згідно з

приведеною вище загальною методикою синтезу (розділ Г, вище). Це давало 4,3мг вказаного в заголовку пептиду 92,3% чистоти (виходячи з ВЕРХ); маспектр: для $C_{157}H_{253}N_{47}O_{43}$, $M=3492,0$; реєстрували m/z :

$[M+2H]^{2+}$: розраховано 1747,0, знайдено 1747,6;

$[M+3H]^{3+}$: розраховано 1165,0, знайдено 1165,4;

$[M+4H]^{4+}$: розраховано 874,0, знайдено 874,0;

$[M+5H]^{5+}$: розраховано 699,4, знайдено 699,4.

Приклад 2

Одержання Сполук (2)-(8)

Використовуючи придатно захищені амінокислоти в методиці повністю аналогічній приведеній вище, одержували наступні пептиди:

(2)

Dat-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr¹⁰-hArg-Orn-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-hArg²⁰-Orn-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Nle-Asp-hArg²⁹-NH₂; МС: для $C_{153}H_{251}N_{43}O_{43}$, $M=3380,9$; реєстрували m/z :

$[M+3H]^{3+}$: розраховано 1128,0, знайдено 1127,9;

$[M+4H]^{4+}$: розраховано 846,2, знайдено 846,2;

$[M+5H]^{5+}$: розраховано 677,2, знайдено 676,9.

(3)

Dat-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr¹⁰-Gab-Gab-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-Gab-Gab-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Asp-Gab-NH₂; МС: для $C_{147}H_{238}N_{47}O_{43}$, $M=3351,8$; реєстрували m/z :

$[M+3H]^{3+}$: розраховано 1118,3, знайдено 1118,6;

$[M+4H]^{4+}$: розраховано 839,0, знайдено 839,2;

$[M+5H]^{5+}$: розраховано 671,4, знайдено 671,6.

(4)

Dat-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr¹⁰-hArg-Gab-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-Gab-Gab-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Asp-Gab-NH₂; МС: для $C_{149}H_{242}N_{47}O_{43}$, $M=3379,8$; реєстрували m/z :

$[M+4H]^{4+}$: розраховано 846,0, знайдено 846,3;

$[M+5H]^{5+}$: розраховано 677,0, знайдено 677,2.

(5)

Dat-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr¹⁰-Gab-hArg-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-hArg-hArg-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Nle-Asp-D-Arg-NH₂; МС: для $C_{154}H_{253}N_{47}O_{43}$, $M=3451,0$; реєстрували m/z :

$[M+3H]^{3+}$: розраховано 1151,3, знайдено 1152,0;

$[M+4H]^{4+}$: розраховано 863,8, знайдено 863,8;

$[M+5H]^{5+}$: розраховано 691,2, знайдено 691,6.

(6)

Dat-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr¹⁰-hArg-Gab-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-hArg-hArg-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Nle-Asp-D-Arg-NH₂; МС: для $C_{154}H_{253}N_{47}O_{43}$, $M=3451,0$; реєстрували m/z :

$[M+3H]^{3+}$: розраховано 1151,3, знайдено 1151,4;

$[M+4H]^{4+}$: розраховано 863,8, знайдено 863,6;

$[M+5H]^{5+}$: розраховано 691,2, знайдено 691,3.

(7)

Dat-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr¹⁰-Gap-Gap-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-Gap-Gap-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Asp-Gap-NH₂; МС: для $C_{142}H_{229}N_{47}O_{43}$, $M=3282,7$; реєстрували m/z :

$[M+3H]^{3+}$: розраховано 1095,2, знайдено 1095,3;

$[M+4H]^{4+}$: розраховано 821,7, знайдено 821,7;

$[M+5H]^{5+}$: розраховано 657,5, знайдено 657,8.

(8)

Dat-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr¹⁰-Gap-Gap-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-hArg-Gap-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Asp-Gap-NH₂; МС: для $C_{145}H_{235}N_{47}O_{43}$, $M=3324,8$; реєстрували m/z :

$[M+3H]^{3+}$: розраховано 1109,3, знайдено 1109,6;

$[M+4H]^{4+}$: розраховано 832,2, знайдено 832,2;

$[M+5H]^{5+}$: розраховано 666,0, знайдено 666,0.

Формула винаходу

1. Аналоги гормону, що вивільнюють гормон росту, що мають амінокислотну послідовність формули (I):

Dat-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr¹⁰-R¹¹-R¹²-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-R²⁰-R²¹

-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Asp-R²⁹-NH₂, (I)

в якій:

R¹¹ є hArg, Gab або Gap;

R¹² є hArg, Orn, Gab або Gap;

R²⁰ є hArg, Gab або Gap;

R²¹ є hArg, Orn, Gab або Gap;

5 R²⁹ є D-Arg, hArg, Gab або Gap;

і їх фармацевтично прийнятні солі.

2. Пептид за пунктом 1, який вибирають з групи, що містить:

(1)

10 Dat-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr¹⁰-hArg-hArg-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-hArg²⁰-hArg-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Asp-hArg²⁹-NH₂;

(2)

Dat-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr¹⁰-hArg-Orn-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-hArg²⁰-Orn-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Asp-hArg²⁹-NH₂;

(3)

15 Dat-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr¹⁰-Gab-Gab-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-Gab-Gab-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Asp-Gab-NH₂;

(4)

20 Dat-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr¹⁰-hArg-Gab-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-Gab-Gab-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Asp-Gab-NH₂;

(5)

Dat-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr¹⁰-Gab-hArg-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-hArg-hArg-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Asp-D-Arg-NH₂;

(6)

25 Dat-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr¹⁰-hArg-Gab-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-hArg-hArg-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Asp-D-Arg-NH₂;

(7)

30 Dat-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr¹⁰-Gap-Gap-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-Gap-Gap-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Asp-Gap-NH₂;

(8)

Dat-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr¹⁰-Gap-Gap-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-hArg-Gap-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Asp-Gap-NH₂.

3. Пептид за пунктом 2, яким є

35 Dat-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr¹⁰-hArg-hArg-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-hArg²⁰-hArg-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Asp-hArg²⁹-NH₂.

4. Пептид за пунктом 2, яким є

40 Dat-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr¹⁰-hArg-Orn-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-hArg²⁰-Orn-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Asp-hArg²⁹-NH₂.

5. Спосіб одержання пептидів - аналогів гормону, що вивільнюють гормон росту, що мають амінокислотну послідовність формули (I):

Dat-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr¹⁰-R¹¹-R¹²-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-R²⁰-R²¹-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Asp-R²⁹-NH₂, (I)

в якій:

45 R¹¹ є hArg, Gab або Gap;

R¹² є hArg, Orn, Gab або Gap;

R²⁰ є hArg, Gab або Gap;

R²¹ є hArg, Orn, Gab або Gap;

50 R²⁹ є D-Arg, hArg, Gab або Gap;

і їх фармацевтично прийнятних солей, що передбачає використання твердофазного синтезу, що включає введення придатних похідних лізину, 2,4-діаміномасляної кислоти або 2,3-діамінопропіонової кислоти в прийнятні положення ланцюга пептиду, приєднаного до полімерного носія, зняття захисту з аміногруп бічного ланцюга і взаємодію вільних аміногруп з гуанідинувальним агентом, видалення всіх т-бутилоксикарбонільних захисних груп, що залишились, і відщеплення синтезованого пептиду від носія, з наступним очищенням і, необов'язково, перетворенням пептиду у фармацевтично прийнятну сіль.

6. Спосіб за пунктом 5, де як полімерний носій використовують МБГА-смола.

7. Спосіб за пунктом 5 або 6, де N,N'-біс(трет-бутилоксикарбоніл)-S-метилізосечовину використовують як гуанідинувальний агент в присутності 4-(диметиламіно)піридину.

60 8. Спосіб за пунктом 5 або 6, де синтезований пептид відщеплюють від носія, використовуючи фторид водню.

9. Спосіб за пунктом 5, де синтезований пептид очищають за допомогою вискоєфективної рідинної хроматографії.

10. Фармацевтична композиція, що містить активну речовину, один або більшу кількість носіїв і/або один або більшу кількість ексципієнтів, де активною речовиною є принаймні один з аналогів гормону, що вивільнюють гормон росту, який має амінокислотну послідовність формули (I):

Dat-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr¹⁰-R¹¹-R¹²-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-R²⁰-R²¹

-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Asp-R²⁹-NH₂, (I)

в якій:

R¹¹ є hArg, Gab або Gap;

5 R¹² є hArg, Orn, Gab або Gap;

R²⁰ є hArg, Gab або Gap;

R²¹ є hArg, Orn, Gab або Gap;

R²⁹ є D-Arg, hArg, Gab або Gap;

10 або його фармацевтично прийнятна сіль.

11. Спосіб лікування розладів, викликаних дефіцитом гормону росту у людини, що включає введення пацієнту, що потребує такого лікування, терапевтично ефективної дози пептиду - аналога hGH-RH, що має амінокислотну послідовність формули (I):

Dat-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr¹⁰-R¹¹-R¹²-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-R²⁰-R²¹

15 -Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Asp-R²⁹-NH₂, (I)

в якій:

R¹¹ є hArg, Gab або Gap;

R¹² є hArg, Orn, Gab або Gap;

20 R²⁰ є hArg, Gab або Gap;

R²¹ є hArg, Orn, Gab або Gap;

R²⁹ є D-Arg, hArg, Gab або Gap;

25 або його фармацевтично прийнятної солі.

30

35

40

45

50

55

60

65

U A 7 9 4 4 0 C 2

U A 7 9 4 4 0 C 2

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (20)..(20)
 <223> Mrg. rousaprinia, 6-ryaniguo-2-ndromponosa rousosa

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (20)..(20)
 <223> Mrg. rousaprinia, 6-ryaniguo-2-ndromponosa

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (21)..(21)
 <223> Cab. opiana

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (27)..(27)
 <223> Mle. rousaprinia

<220> 2
 Mrg. Mle. Mrg. Mle. Mle. Mle. Mle. Mle. Mle. Mle. Mle. Mle. Mle. Mle. Mle. Mle.
 1 5 10 15

Mrg. Mle. Mle. Mle. Mle. Mle. Mle. Mle. Mle. Mle. Mle. Mle. Mle. Mle. Mle.
 20 25

<210> 3
 <211> 39
 <212> Mrg
 <213> Comment

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Mrg. rousaprinia, 1-(4'-ryaniguo-2-ndromponosa rousosa

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 <223> Cab. 4-ryaniguo-2-ndromponosa rousosa

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (20)..(21)
 <223> Cab. 4-ryaniguo-2-ndromponosa rousosa

U A 7 9 4 4 0 C 2

U A 7 9 4 4 0 C 2

<320>
 <321> NINC_FEATURE
 <322> (39) .. (39)
 <323> Gab-9H, 4-pyridinno-2-azikotopyridin

<400> A
 Max Ala Arg Ala His Phe Tyr Arg Ser Tyr Val Leu Ala Glu
 1 5 10 15
 Leu Ser Ala Val Leu Leu Glu Arg His Val Arg Val
 20 25

<310> S
 <311> 24
 <312> PPT
 <313> Currencont

<320>
 <321> NINC_FEATURE
 <322> (1) .. (1)
 <323> Bat, zapamozipostu, 3-(4'-nizpovozhenskiponitovosa kucnosa.

<320>
 <321> NINC_FEATURE
 <322> (1) .. (1)
 <323> Gab, 4-pyridinno-2-azikotopyridin kucnosa.

<320>
 <321> NINC_FEATURE
 <322> (1) .. (1)
 <323> Gab, kotsapnina, 6-pyridinno-2-azikotopyridin kucnosa

<320>
 <321> NINC_FEATURE
 <322> (20) .. (21)
 <323> Gab, kotsapnina, 5-pyridinno-2-azikotopyridin kucnosa

<320>
 <321> NINC_FEATURE
 <322> (27) .. (27)
 <323> Ala, kotsapnina

<320>
 <321> NINC_FEATURE
 <322> (29) .. (29)
 <323> D-Arg-9H, 2-epitiazin

U A 7 9 4 4 0 C 2

U A 7 9 4 4 0 C 2

<100> 5
 Ser Ala Arg Ala Thr Phe Thr Asn Ser Tyr Asp Lys Val Leu Ala Gly
 1 5 10 15

Leu Ser Ala Lys Lys Leu Leu Glu Arg His Lys Arg Lys
 20 25

<110> 6
 <111> 29
 <112> SEQ
 <113> Cysteine

<120>
 <121> SEQ_FEATURE
 <122> (1)..(1)
 <123> Det. N-acetylcysteine, S-(1'-cysteine)proline derivative

<130>
 <131> SEQ_FEATURE
 <132> (11)..(11)
 <133> His, N-acetylmethionine, S-cysteine-2-methylproline derivative

<140>
 <141> SEQ_FEATURE
 <142> (20)..(21)
 <143> His, N-acetylmethionine, S-cysteine-2-methylproline derivative

<150>
 <151> SEQ_FEATURE
 <152> (25)..(25)
 <153> His, S-cysteine-2-methylproline derivative

<160>
 <161> SEQ_FEATURE
 <162> (27)..(27)
 <163> His, Cysteine

<170>
 <171> SEQ_FEATURE
 <172> (28)..(28)
 <173> P-Arg-His, D-sprindamide

<180> 6
 Ser Ala Arg Ala Thr Phe Thr Asn Ser Tyr Lys Lys Val Leu Ala Gly
 1 5 10 15

Leu Ser Ala Lys Lys Leu Leu Glu Arg His Lys Arg Lys
 20 25

U A 7 9 4 4 0 C 2

U A 7 9 4 4 0 C 2

<200> 7
<211> 29
<212> ENR
<213> Government

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (1)
<223> Pat, maculivipowu, 2-(4'-xipocwefwila)gpolizosa mictosa

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11) .. (12)
<223> Sap, 1-mwawawaw-1-gilicopolizosa mictosa

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (20) .. (21)
<223> Sap, 2-mwawawaw-2-gilicopolizosa mictosa

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (27) .. (27)
<223> Ala, mawawawaw

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (29) .. (29)
<223> Sap-22: 1-mwawawaw-2-gilicopolizosa

<400> 7
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
1 5 10 15

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
20 25

<210> 7
<211> 29
<212> ENR
<213> Government

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (1)
<223> Pat, maculivipowu, 1-(4'-xipocwefwila)gpolizosa mictosa

U A 7 9 4 4 0 C 2

U A 7 9 4 4 0 C 2

