(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 특허공보(B1)

(51) Int. Cl.[5]
C07K 7/10
A61K 37/24

(45) 공고일자 1991년01월24일
(11) 공고번호 특1991-0000379

(21) 출원번호	특1985-0003400	(65) 공개번호	특1985-0008681
(22) 출원일자	1985년05월17일	(43) 공개일자	1985년12월21일

(30) 우선권주장 611844 1984년05월18일 미국(US)

(71) 출원인 더 솔크 인스티튜트 훠 바이올로 지칼 스터디이즈 델버어트 어니스트 그랜즈
미합중국 캘리포니아주 92037 라호이아시 노오스 토오리 파인즈 로오드 10010

(72) 발명자 와일리 워어커 베일 쥬니어
미합중국 캘리포니아주 92037 라호이아시 발데즈 1643
지인 에드워어드 프레드릭 리비어
미합중국 캘리포니아주 92037 라호이아시 블랙골드 로오드 9674

(74) 대리인 차윤근, 차순영

심사관 : 정훈 (책자공보 제2164호)

(54) 합성 GRT 펩티드

요약

내용 없음.

명세서

[발명의 명칭]

합성 GRT 펩티드

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 인간과 그외의 동물내에서 뇌하수체의 기능에 영향을 미치는 펩티드 제조에 관한 것이다. 특히 본 발명은 뇌하수체에 의한 성장 호르몬의 분비를 증진시키는 펩티드 제조에 관한 것이다.

생리학자들은, 시상하부가 노하수체전엽의 분비기능을 조절한다는 것과 아울러 시상하부가 각 뇌하수체 호르몬의 분비를 자극하거나 억제하는 특정 물질을 생산한다는 것을 오랫동안 인지해왔었다. 시상하부 억제인자는, 성장 호르몬(GH)의 분비를 억제하는 소마토스타틴(somatostatin)의 형태로 1972년에 규명되었다. 1982년에 인간의 췌장 종양 추출물로부터 인간 췌장(중양) 분비인자(hpGRF)가 분리되고 정제, 규명, 합성및 검사되었는데, 그 결과 이 인자는 뇌하수체에 의해 GH가 분비되는 것을 증진시킨다는 사실을 발견하였다. 이들 2개의 뇌하수체 인자는 총 합성에 의해 재생산 되어왔고, 천연 구조의 유사체가 합성되었다. 인간의 시상하부 GH 분비인자는 정확하게 동일한 구조를 갖는다고 생각되어지므로, 이하에서는 hGRF라는 용어를 사용하기로 한다. 상응되는 쥐의 시상하부 GH 분비인자(rGRF), 상응되는 돼지의 시상하부 GH 분비인자(pGRF) 및 상응되는 소의 시상하부 GH 분비인자(bGRF) 또한 규명되고 합성되었다.

이제, 배양된 뇌하수체 세포로부터 GH를 분비시키고 체내에서 효소 분해에 대해 적어도 부분적으로 저항할 수 있으며, 실제상 매우 증가된 효력을 나타내는 합성 폴리펩티드가 합성되었다. 이들 펩티드는 2-위치에 $N^{a}CH_3$-D-Ala(D-NMA) 및/또는 14-위치에 D-Leu 및/또는 29-위치에 D-Arg을 가지며, 바람직하게는 27-위치에 Nle도 갖는다. D-Leu는 17- 및/또는 23-위치에 존재할 수 있으며, D-Glu나 D-Asp중 어느 하나는 25-위치에 존재할 수 있다. 또한, 본 펩티드는 1-위치에 다음과 같은 잔기중 하나를 가질 수 있다 : Tyr, D-Tyr, Met, Phe, D-Phe, pCl-Phe, Leu, His 및 D-His(이들 잔기는 α-탄소 또는 α-아미노기상에 메틸 치환기를 임의로 가질 수있다). 이들은 3-위치에 D-Asp 및/또는 8-위치에 D-Arg이나 D-Ser 및/또는 10-위치에 D-Tyr 및/또는 15-위치에 D-Ala을 임의로 가질 수 있다. 또한 이들은, 27-위치의 Nle 또는 Met 대신에 D-Met 또는 Nva를 가질 수 있다.

본 발명에 따른 제약 조성물은 펩티드 길이안의 잔기가 약 27-44인 유사체나, 혹은 제약상 또는 수의학상 허용가능한 액체나 고체담체에 분산된 이들의 부독성염을 포함한다. 그러한 제약 조성물들은, 치료목적상 투여하는 인간 및 수의학에 있어서의 임상 의약으로 사용될 수 있고 또한 진단학적으로도 사용될 수 있다. 더우기 그들은, 가금을 포함하는 온혈 동물의 성장을 증진시키는데 사용되며 냉혈 동물(예 : 물고기, 뱀장어등)의 수중배양에 사용된다.

펩티드를 정의하는데 사용되는 명명법은 문헌["The Peptides", Schroder & Lubke의 저서, Academic Press(1965)]에 명시되어 있는데, 이 문헌에서는 통상적인 표면방식에 따라, N-말단의 아미노기가

왼쪽에, C-말단의 카르복실기가 오른쪽에 나타나도록 표현한다. 천연 아미노산이란, 단백질에서 발견되는 Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, Thr, Lys, Arg, Asp, Asn, Glu, Gln, Cys, Met, Phe, Tyr, Pro, Trp 및 His로 구성되는 통상적이고 천연 발생적인 아미노산을 의미한다. Nle는 노르로이신을 뜻하고, Nva는 노르발린을 뜻한다. 아미노산 잔기가 이성체 형태를 갖는 경우, 다른 지적이 없는 한, 표현되는 것은 아미노산의 L-형이다. D-NMA는 α-아미노기가 메틸로 치환된 알라닌의 D-이성체를 뜻한다.

본 발명은 하기 구조(I)의 합성 펩티드를 제공한다 : R_1-R_2-R_3-Ala-Ile-Phe-Thr-R_8-Ser-R_{10}-Arg-R_{12}-R_{13}-R_{14}-R_{15}-Gln-R_{17}-R_{18}-Ala-Arg-Lys-Leu-R_{23}-R_{24}-R_{25}-Ile-R_{27}-R_{28}-R_{29}-Gln-Gln-Gly-Glu-R_{34}-Asn-Gln-Glu-R_{38}-R_{39}-R_{40}-Arg-R_{42}-R_{43}-R_{44}

상기 식에서 R_1은 C^aMe 또는 N^aMe 치환체를 갖거나 또는 비치환된 Tyr, D-Tyr, Met, Phe, D-Phe, pCl-Phe, Leu, His 또는 D-His ; R_2는 Ala, D-Ala 또는 D-NMA ; R_3는 Asp 또는 D-Asp ; R_8은 Ser, Asn, D-Ser 또는 D-Asn ; R_{10}은 Tyr 또는 D-Tyr ; R_{12}는 Arg 또는 Lys ; R_{13}은 Ile 또는 Val ; R_{14}는 Leu 또는 D-Leu ; R_{15}은 Gly 또는 D-Ala ; R_{17}은 Leu 또는 D-Leu ; R_{18}은 Tyr 또는 Ser ; R_{23}은 Leu 또는 D-Leu ; R_{24}는 His 또는 Gln ; R_{25}는 Glu, Asp, D-Glu 또는 D-Asp ; R_{27}은 Met, D-Met, Ala, Nle, Ile, Leu, Nva 또는 Val ; R_{28}은 Asn 또는 Ser ; R_{29}는 Arg 또는 D-Arg ; R_{34}는 Arg 또는 Ser ; R_{38}은 Gln 또는 Arg ; R_{39}는 Arg 또는 Gly ; R_{40}은 Ser 또는 Ala ; R_{42}는 Phe, Ala 또는 Val ; R_{43}은 Asn 또는 Arg ; R_{44}는 천연 아미노산이고 ; 단, R_{28} 부터 R_{44}까지(R_{28},R_{44} 포함)의 어느 잔기 또는 그 모두가 삭제될 수 있으며, R_2가 D-NMA 및/또는 R_{14}가 D-Leu 및/또는 R_{29}가 D-Arg이다. 이제부터는 "Y"를 사용하여 C-말단 아미노산 잔기의 카르복실 성분을 표현하기로 하는데, Y는 하기 라디칼중 어느 것이든 될 수 있다 : -COOR, -CRO, -CONHNHR, -CON(R)(R') 또는 $-CH_2OR$(여기서 R과 R'는 저급알킬, 플루오로 저급알킬, 또는 수소이고, 바람직한 저급알킬기는 메틸, 에틸 및 프로필이다). 잔기가 44-위치내에 포함될때, 이량체를 생성시키거나 혹은 합성 펩티드를 다른 펩티드에 연결할 필요가 있는 경우외에는 Cys 이외의 아미노산을 선택한다. Met이 제1위치에 있을 경우, 제27위치에 또다른 잔기를 갖는 것이 바람직하다.

위에서 정의한 바와 같이, N-말단으로부터 제27잔기까지 뻗은 단편은 뇌하수체에 의한 GH 분비에 영향을 미치는 생물학적 효력을 가지며, 그와 같은 생물학적 활성 단편은 본 발명 범주내의 것이라 간주된다. 펩티드 단편이 제27잔기 또는 28잔기에 까지만 뻗어있는 경우 Y는 $-CONH_2$ 이거나 치환된 아미드이어야 한다. 단편이 제 29잔기-39잔기중 어느 하나에 까지 뻗어 있을 경우 Y는 아미드 또는 치환 아미드인 것이 바람직하지만 -COOH 일 수 있다. 단편이 40개 또는 그 이상의 잔기를 가질 경우 C-말단 성분으로서 뚜렷하게 바람직한 것은 없다. 펩티드는 완전 고상법, 부분 고상법, 단편 축합 또는 고전적인 용액 커플링과 같은 적절한 방법에 의해 합성한다. 최근 개발된 제조합 DNA법을 사용하여 천연 아미노산 잔기만을 함유하는 유사체 부분을 제조할 수 있는데 이것은 짧은 N-말단 펩티드에 연결될 수 있다. 예컨대 완전 고상합성법은 문헌["고상 펩티드 합성", Stewart & Young, Freeman & Co., 샌프란시스코, 1969]에 설명되어 있으며, 미국특허 제4,105,603호(Vale 등 ; 특허일자 : 1978. 8.8)에 예증되어 있다. 고전적인 용액 합성법은 논문["Methoden der Organischen Chemie(Houben-Weyl) : Synthese von Peptiden", E.Wunsch(편집자)(1974) Georg Thieme Verlag, Stuttgart, W. Ger.]에 상세히 기술되어 있다. 단편 축합 합성법은 미국특허 제3,972,859호(1976. 8.3)에 예증되어 있다. 그외의 유용한 합성법이 미국특허 제3,842,067호(1974. 8.15) 및 미국특허 제3,862,925호(1975. 1.28)에 예시되어 있다.

그러한 합성법에서의 공통점은 각종 아미노산 성분의 불안정한 결사슬을 적합한 보호기로 보호시키는 것인데, 이같은 보호기들은 그들이 궁극적으로 제거될 때까지 그 부위에서의 화학반응 발생을 방지한다. 또하나의 공통점은, 카르복실기상에서 반응이 일어나는 동안 아미노산 또는 단편의 α-아미노기를 보호한 후, 뒤이어 그 부위에서 반응이 일어나도록 α-아미노 보호기를 선택적으로 제거해서, 그 위치에서 다음 반응이 일어나도록 하는 것이다. 그에 따라, 합성중의 한가지 단계로서, 펩티드 사슬내의 원하는 순서에 위치한 개개의 아미노산 잔기를 포함하며, 보호기가 적합한 잔기에 결합되어 있는 중간 화합물이 생산되는 것이 보통이다.

하기 구조식(II)의 중간 화합물도 본 발명의 범주내의 것이라고 간주된다 : X^1-R_1 (X 또는 X^2)-R_2-R_3X^3)-Ala-Ile-Phe-Thr(X^4)-R_8(X^4 또는 X^5)-Ser(X^4)-R_{10}(X^2)-Arg(X^6)-R_{12}(X^6 또는 X^7)-R_{13}-R_{14}-R_{15}-Gln(X^5)-R_{17}-R_{18}(X^2)-Ala-Arg(X^6)-Lys(X^7)-Leu-R_{23}-R_{24} (X^4 또는 X^5)-R_{25}(X^3)-Ile-R_{27}-R_{28}(X^4 또는 X^5)-R_{29}(X^6)-Gln(X^5)-Gln(X^5)-Gly-Glu(X^3)-R_{34}(X^4 또는 X^6)-Asn(X^5)-Gln(X^5)-Glu(X^3)-R_{38}(X^5 또는 X^6)-R_{39}(X^6)-R_{40}(X^4)-Arg(X^6)-R_{42}-R_{43}(X^5 또는 X^6)-R_{44}(X^8)-X^9상기 식에서, X^1은 수소 또는 α-아미노 보호기이다.

X^1으로 표현되는 α-아미노 보호기는 폴리펩티드의 단계적 합성분야에 유용한 공지의 것이다. X^1으로서 사용될 수 있는 α-아미노 보호기의 유형으로는 (1) 방향족 우레탄형 보호기[예 : 플루오레닐메틸옥시카르보닐(FMOC), 젠질옥시카르보닐(Z) 및 치환된 Z(예 : p-크로로벤질옥시카르보닐, p-니트로벤질옥시카르보닐, p-브로모벤질옥시카르보닐 및 p-메톡시벤질옥시카르보닐)] ; (2) 지방족 우레탄 보호기[예 : t-부틸옥시카르보닐(BOC), 디이소프로필메틸옥시카르보닐, 이소프로필옥시카르보닐, 에톡시카르보닐, 알릴옥시카르보닐] ; (3) 시클로알킬 우레탄형 보호기[예 :

사클로펜틸옥시카르보닐, 아다만틸옥시카르보닐 및 시클로헥실옥시카르보닐]이 있다. N^a Me-치환 잔기가 1-위치에 사용될 때에라도, 바람직한 α-아미노 보호기는 BOC이다.

X는 수소이거나 또는 His의 이미다졸 질소에 대한 보호기(예 : Tos)이다.

X^2 는 Tyr의 페놀성 수산기에 대한 적합한 보호기[예 : 테트라히드로피란일, tert-부틸, 트리틸, Bzl,CBZ,4Br-CBZ 및 2,6-디클로로벤질(DCB)]일 수 있다. 바람직한 보호기는 2,6-디클로로벤질(DCB)이다. X^2 는 수소일 수 있는데, 이것은 그 위치에 있는 아미노산 잔기에 결사슬 보호기가 없다는 것을 의미한다.

X^3 는 수소이거나 또는, Asp 혹은 Glu의 카르복실기에 대한 적합한 에스테르 형성 보호기[예 : 벤질(OBzl), 2,6-디클로로벤질, 메틸 및 에틸]이다.

X^4 는 Thr 또는 Ser의 수산기에 대한 적합한 보호기(예컨대 아세틸, 벤조일, tert-부틸, 트리틸, 테트라히드로 피라닐, Bzl, 2,6-디클로로벤질 및 CBZ)일 수 있다. 바람직한 보호기는 Bzl이다. X^4 는 수소일 수 있는데, 이것은 수산기에 보호기가 없음을 의미한다.

X^5 는 수소이거나 혹은 , Asn이나 Gln의 겹사슬 아미도기에 대한 적합한 보호기인데, 바람직한 것은 크산틸(Xan)이다. X^6 는 Arg의 구아니디노기에 대한 적합한 보호기(예 : 니트로, Tos, CBZ 아다만틸옥시카르보닐 및 BOC)이거나 수소이다.

X^7 은 Lys의 곁사슬 아미노기에 대한 적합한 보호기이다. 곁사슬 아미노 보호기중 적합한 것의 예로는 2-클로로벤질 옥시카르보닐(2-Cl-Z), Tos, t-아밀옥시카르보닐 및 BOC가 있다.

X^8은 수소이거나 혹은 전술한 바와 같이 적합한 곁사슬 보호기이다.

Met는 산소에 의하여 임의로 보호될 수 있지만, 보호하지 않은 채로 두는 것이 바람직하다. 합성과정중 α-아미노기를 탈보호시키는 동안 제거되지 않는 보호기를 선택할 경우를 제외하고는, 곁사슬 아미노 보호기의 선택은 결정적인 것이 아니다. 그러나 몇몇 아미노산의 경우(예 : His)에는, 커플링 완료후의 보호가 필수적인 것이 아니며 보호기는 동일할 수 있다.

X^9 는 C-말단 카르복실기에 대한 적합한 보호기(예 : 에스테르 형성기 X^3), 또는 고상 합성반응에서 고체수지지지체에 결합시키기 위해 사용되는 고정결합, 또는 데스-X^9 인데 이 경우 C-말단에 있는 잔기는 위에서 Y로 정의한 바와 같은 카르복실 성분을 갖는다. 고체 수지지지체가 사용되는 경우 이것은 당분야에 공지된 어떠한 것이라도 좋은데, 예로써 하기 구조를 갖는 것이있다 : -o-CH_2-수지지지체, -NH- 벤즈히드릴아민(BHA)수지지지체 또는 -NH- 파라메틸벤즈히드릴아민(MBHA)수지지지체. 비치환 아미드가 요구될 경우, BHA 또는 MBHA의 사용이 바람직한데, 이는 분해되어서 직접 아미드를 생성시키기 때문이다. N-메틸 아미드가 요구될 경우, 이것은 N-메틸 BHA 수지로부터 생성될 수 있다. C-말단상에서 그외의 비치환 아미드가 요구되거나 또는 유리산 이외의 기가 요구될 경우, 문헌(Houben-Weyl text)에 나온 바와 같은 고전적인 방법을 이용하여 펩티드를 합성함이 바람직하다.

중간 생성물에 대한 구조식에 있어서, X-기중의 적어도 하나는 보호기이거나, 또는 X^9 는 수지지지체를 포함한다. 따라서 본 발명은 하기의 단계(a),(b) 및 (c)에 의해 흥미있는 펩티드를 제조하는 방법도 제공한다 ; (a) 적어도 한개의 보호기를 가지며, X,X^1,X^2,X^3,X^4,X^5,X^6,X^7 및 X^8가 각각 수소 도는 보호기이고, X^9가 보호기이거나 또는 수지지지체에 대한 고정결합이거나 또는 des-X^9(이 경우 C-말단의 잔기는 Y로 정의한 바 있는 카르복실 성분을 갖는다)인 구조식(II)를 갖는 펩티드를 형성시키고 ; (b) 보호기 또는 기들 또는 고정결합을 구조식(II)의 펩티드로부터 분리시키고 ; (c) 필요하다면, 산출된 구조식(I)의 펩티드를 그의 무독성염으로 전환시킨다.

본 펩티드의 합성에 사용될 특정 곁사슬 보호기를 선택함에 있어서 다음과 같은 일반적인 규칙을 따른다 ; (a) 보호기는 그 보호 성질을 보유하고, 커플링 조건하에 분리되지 않는 것이 바람직하다 ; (b) 보호기는 시약에 대한 안정성이 있어야 하며, Xan을 제외하고는, 각 합성단계에서 α-아미노 보호기의 제거를 위해 선택된 반응 조건하에 안정한 것이 바람직하다 ; (c) 곁사슬 보호기는 펩티드 사슬을 변화시키지 않을 반응조건하에서 원하는 아미노산 순서의 합성이 완료되는 즉시 제거되는 것이어야 한다.

펩티드가 재조합 DNA 기술을 이용하여 제조되지 않을 경우에는, 전술한 바와 같이 다른 공지의 화학 합성법을 사용할 수는 있으나, 메리필드의 문헌[J. Am. Chem. Soc., 85, p2149(1963)]에 기술된 바와 같은 고상 합성법을 이용하여 제조하는 것이 바람직하다. 고상 합성은, 보호된 α-아미노산을 적합한 수지에 커플링시킴으로써, 펩티드의 C-말단으로부터 개시된다. 그러한 출발물질은, α-아미노-보호 아미노산을 에스테르 결합에 의해 클로로메틸화 수지나 히드록시메틸 수지에 부착시키거나, 또는 아미드 결합에 의해 BHA 수지나 MBHA 수지에 부착시킴으로써 제조될 수 있다. 히드록시메틸 수지의 제법은 문헌[Bodansky등의 저서 ; Chem. Ind.(런던) 38, 1597-98(1966)]에 기술되어 있다. 클로로메틸화 수지는 Bio Rad 연구소(Richmond, California)와 Lab. 시스템사에서 시판된다. 그러한 수지의 제법은 문헌[Stewart등의 저서 ; "고상 펩티드 합성"(Freeman & Co., San Francisco, (1969)]에 기술되어 있다. BHA와 MBHA 수지지지체는 상업적으로 구입가능하며, 합성되고 있는 소요의 폴리펩티드의 C-말단에 비치환 아미드가 있을 경우에만 사용된다.

BOC 및 Xan으로 보호된 C-말단 아미노산(예 : Asn)은 43-잔기의 펩티드가 합성될때, 문헌[Chemistry Letters, K. Horiki ; 165-168(1978)]에 설명된 방법에 따라, 약 60℃에서 24시간 동안 교반시키면서 DMF내의 KF를 사용하여 클로로메틸화수지에 처음으로 결합시킬 수 있다. BOD로 보호된 아미노산을 수지지지체에 커플링시킨 후에, 염화메틸렌내의 트리플루오로 아세트산(TFA) 또는 TFA만을 사용함으로써 α-아미노 보호기를 제거한다. 탈보호는 약 0℃ 내지 실온하에서 수행된다. 문헌[Sohroder

& Lubk의 저서 "The peptides", [1] pp 72-75(아카데미 출판사(1965)]에 기재된 바와 같이, 디옥산내의 HCl과 같은 다른 표준 분해 시약 및 특정 α-아미노 보호기 제거 조건이 사용될 수 있다.

α-아미노 보호기를 제거한 후, 남아있는 α-아미노- 및 곁사슬이 보호된 아미노산을 원하는 순서로 단계적으로 결합시켜 위에서 정의한 중간체 화합물을 얻는다. 또는 합성시에 각 아미노산을 따로따로 첨가한 것에 대한 대안으로서, 고상 반응기에 첨가하기에 앞서 그들중 몇몇을 서로 결합시킬 수 있다. 적합한 커플링제의 선택은 당분야 기술의 범주내의 것이다. 커플링제로서 특히 적합한 것은 N,N'-디시클로헥실카르보디이미드(DCCI)이다.

펩티드의 고상 합성에 사용되는 활성화제는 펩티드 기술분야에 공지되어 있다. 적합한 활성화제의 예로써 N,N'-디이소프로필카르보디이미드 및 N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드와 같은 카르보디이미드가 있다. 그외의 활성화제 및 그들을 펩티드의 커플링에 사용하는 것이 문헌[Schroder & Lubke의 저서, 제III장 및 Kapoor의 저서 J. Phar. Sci., 59,pp 1-27(1970)]에 기재되어 있다.

보호된 각 아미노산 또는 아미노산 서열을 약 4배 또는 그 이상의 과잉량으로 고상 반응기내에 도입시키고, 디메틸포름 아미드(DMF) : CH_2Cl_2(1:1)의 매체내에서 또는 DMF나 CH_2Cl_2 단독 존재하에 커플링 반응을 수행할 수 있다. 커플링이 불완전하게 일어나는 경우에는 다음 아미노산이 커플링되기에 앞서 α-아미노 보호기가 제거되기 전에 커플링 과정을 되풀이 한다. 각 합성단계에서의 커플링 반응(수동적으로 수행할 경우) 성취는 문헌[E. Kaiser등의 저서, Anal Biochem. 34,595(1970)]에 기재된 바와 같이 닌히드린 반응으로 조정하는 것이 바람직하다. 커플링 반응은 문헌[Rivier등의 저서, Biopolymers, 1978,17,pp 1927-1938]에 기재된 계획을 이용하여 백크만 990 자동 합성기상에서 자동적으로 진행시킬 수 있다.

원하는 아미노산 서열이 완성된 후, 액체 불화수소와 같은 시약으로 처리함으로써 중간체 펩티드를 수지 지지체로 부터 분리시킬 수 있는데, 상기 액체 불화수소는 펩티드를 수지로부터 분리시킬 뿐 아니라, 남아있는 모든 곁사슬 보호기 [$X,X^2,X^3,X^4,X^5,X^6,X^7$ 과 X^8 및 고정 결합 X^9과, 만약 사용되는 경우 α-아미노 보호기 X^1을 분해시켜 유리산 형태의 펩티드를 생성시킨다. Met이 아미노산 서열내에 존재하는 경우에는, HF를 사용하여 수지에서 펩티드를 분리시키기에 앞서 먼저 트리플루오로아세트산(TFA)/에탄디티올로BOC 보호기를 제거함으로써, 잠재적인 S-알킬화를 제거하는 것이 바람직하다. 분리용 분화수소가 사용될때는, 반응 용기의 스캐빈저(scavenger)로서 아니솔 및 메틸에틸 황화물이 포함된다.

하기의 실시예에는, 고상법에 의한 펩티드 합성의 바람직한 방법이 설명되어 있다. 사슬의 어느 한 말단에서 필요한 아미노산 수를 제거하는 것만으로 더 짧은 펩티드 단편을 동일한 방법으로 합성할 수 있다는 것을 알수 있을 것이다. 그러나 생물학상 활성 단편은, 지시된 아미노산 서열을 N-말다상에 함유해야 된다고 생각된다.

[실시예 1]

하기의 구조를 갖는 펩티드[N^a MeTyr[1], D-NMA[2], D-Leu[23]]-rGRF(1-43)-OH의 합성은, Beckman 990 펩티드 합성기를 사용하여 클로로메틸화수지(치환 범위 ; 약 0.1-0.5밀리몰/수지의 g)상에서 단계적 방법으로 수행한다 : N MeTyr-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Ser-Ser-Tyr-Arg-Arg-Ile-Leu-Gly-Gln-Leu-Ala-Tyr-Arg-Lys-Leu-D-Leu-His-Glu-Ile-Met-Asn-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-Arg-Ser-Arg-Phe-Asn-OH

문헌(Chemistry Letters ; 전술하였음)에 기재된 일반적 공정에 따라 DMF내의 KF를 이용하여 교반하에 60℃에서 24시간 동안 반응을 진행시킴으로써 BOC-Asn(Xan)을 수지에 커플링시키면, 수지의 g당 약 0.35 밀리몰의 Asn이 치환된다.

탈보호시키고 중화시킨 후, 펩티드 사슬을 수지상에 단계적으로 조립시킨다. 탈보호, 중화 및 각 아미노산의 첨가는 문헌[Rivier의 저서 ; J, J.Amer.Chem.Soc., 96,2986-2992(1974)]에 상술된 공정에 따라 수행된다. Met 잔기의 황을 산화시킬 수 있는 산소의 부재를 확실히 하기 위하여, 불활성 기체(예 : 헬륨 또는 질소)를 살포함으로써, 사용되는 모든 용매로부터 기체를 제거한다.

차단해리는 하기의 계획표 A에 따라 수행되는 것이 바람직하다.

[계획표 A]

시 약		혼합시간(분)
1. 60% TFA/2%	에탄디티올	10
2. 60% TFA/2%	에탄디티올	15
3. IPA/1%	에탄디티올	0.5
4. CH_2Cl_2 내의	Et_3N(10%)	0.5
5. MeOH		0.5
6. CH_2Cl_2 내의	Et_3N(10%)	0.5
7. MeOH	(2회)	0.5
8. CH_2Cl_2 -	(2회)	0.5

커플링 반응은 하기 계획표에 기재된 바와 같이 수행되는 것이 바람직하다.

[계획표 B]

사 약	혼합시간(분)
9. DCCI	—
10. Boc-아미노산	50-90
11. MeOH (2회)	0.5
12. CH_2Cl_2 (2회)	0.5
13. CH_2Cl_2 내의 AC_2O(3M)	15.0
14. CH_2Cl_2	0.5
15. MeOH	0.5
16. CH_2Cl_2 (2회)	0.5

요약하자면, 메틸렌클로라이드 내의 1.0몰 농도 DCCI 1당량 존재하에 염화메틸렌 내의 BOC로 보호된 아미노산 1-2 밀리몰을 사용한다. (2시간 동안) BOC-Arg(TOS)가 커플링 될 시에는 50% DMF와 염화메틸렌의 혼합물이 사용된다. Ser과 Thr에 대한 히드록실 곁사슬 보호기로는 Bzl 에테르가 사용된다. DCC커플링을 사용함이 바람직할 경우에는, Asn 또는 Glh의 아미도기를 Xan으로 보호한다.

P-니트로페닐 에스테르(ONp)를 사용하여 Asn 또는 Gln의 카르복실 말단을 활성화시킬 수도 있는데, 예를 들어 DMF와 염화메틸렌의 50% 혼합물 내의 HOBt 1당량을 사용하여 하룻밤 동안 BOC-Asn(ONp)를 결합시킬수 있다 (이 경우, DCC를 첨가하지 않음). Lys의 곁사슬 보호기로는 2-클로로-벤질옥시카르보닐(2Cl-Z)이 사용된다. Arg의 구아니디노기 및 His의 이미다졸질소를 보호하기 위해 Tos가 사용되며, Glu 또는 Asp의 곁사슬 카르복실기는 OBzl로 보호한다. Tyr의 페놀성 수산기는 2,6-디클로로벤질(DCB)로 보호한다. 합성이 완결되면 하기의 조성물이 수득된다 : BOC-N^{a} MeTyr(X^2)-D-NMA-Asp(X^3)-Ala-Ile-Phe-Thr(X^4)-Ser(X^4)-Ser(X^4)-Tyr(X^2)-Arg(X^6)-Arg(X^6)-Ile-Leu-Gly-Gln(X^5)-Leu-Tyr(X^2)-Ala-Arg(X^6)-Lys(X^7)-Leu-D-Leu-His(X)-Glu(X^3)-Ile-Met-Asn(X^5)-Arg(X^6)-Gln(X^5)-Gln(X^5)-Gly-Glu(X^3)-Arg(X^6)-Asn(X^5)-Gln(X^5)-Glu(X^3)-Gln(X^5)-Arg(X^6)-Ser(X^4)-Arg(X^6)-Phe-Asn(X^5)-X^9

상기 식에서, X^2는 DCB, X^3는 OBzl, X^4는 Bzl, X^5는 Xan, X^6는 Tos, X^7은 2Cl-Z이고 X^9은 -O-CH_2-수지 지지체이다. Xan은 α-아미노 보호기의 차단해리에 사용되는 TFA 처리에 의해 부분적으로 또는 전부 제거될 수 있다.

보호된 펩티드-수지를 분리 및 탈보호시키기 위하여, 이것을 펩티드-수지 1g당 1.5ml의 아니솔, 0.5ml의 메틸에틸설파이드 및 15ml의 불화수소(HF)를 사용하여 -20℃에서 0.5시간, 0℃에서 0.5시간 동안 처리한다. 고진공하에 HF를 제거한 후, 수지-펩티드 잔류물을 건조 디에틸에테르와 클로로포름을 사용하여 교대로 세척한 후, 펩티드를 가스가 제거된 2N 수성초산으로 추출시키고, 여과에 의해 수지로부터 분리시킨다.

분리되고 탈보호된 펩티드를 0-5% 초산 내에 용해시킨 후 정제시키는 데, 상기 정제단계의 예로서 Sephadex G-50 미소 겔 여과법이 있다.

펩티드를 문헌[Rivier 등의 저서, 펩티드 : 구조 및 생물학적 기능(1979) pp 125-8 ; Marki 등의 저서, J.Am.Chem.Soc.103, 3178(1981)]에 기재된 바와 같이 분석용 또는 반분석용 HPLC에 의해 더 정제시킨다. prep LC-500(Cartridges fitting Waters Associates)에다 15-20u C_{18} 실리카[Vydac(300 A)]를 채워 넣는다.

문헌[Rivier.J.의 저서 ; J.Liq.Chromatogaphy 1, 343-367(1978)]에 기재된 바와 같이, 저압 Eldex 구배 제조기에 의하여 TEAP 내의 CH_3CN 구배를 만든다. 크로마토그라피에 의한 분절들을 HPLC로 조심스럽게 탐지하여, 실질상 순수한 분절들 만을 모은다. 0.1% TFA내의 CH_3CN 구배를 이용하여, 순도가 각기 조사된 정제 분절들로부터 염분을 제거한다. 중아분절을 동결 건조시켜, 순도가 98% 이상인 소요의 펩티드를 생산한다.

MBHA 수지를 사용하고, Asn을 MBHA 수지에 결합시키기 위해 미국 특허 제4,292,313호(Vale 등)에 기재된 초기 공정을 이용하여 합성단계를 반복함으로써, 아미드화 C-말단을 갖는 동일한 펩티드를 생산한다.

[실시예 2]

하기 구조를 갖는 40-잔기의 아미드화 펩티드[C^{a} MeHis^{1}, D-NMA^{2}, D-Leu^{23}]-hGRF(1-40)-NH_2의 합성은 미국특허 제4,292,313호(Vale 등)에 기술된 바와 같이, Beckman 990 펩티드 합성기를 사용하여 MBHA 수지상에서 단계적 방법으로 수행한다. TLC 및 HPLC를 사용한 결과, 본 펩티드는 실질상 순수하다는 것이 입증되었다.

H-C^{a} MeHis-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-D-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-Ser-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Ser-Asn-Gln-Glu-Arg-Gly-Ala-NH_2

[실시예 3]

하기 구조를 갖는 [D-NMA^{2}, Nle^{27}]-rGRF(1-43)-OH의 합성은 Beckman 990 펩티드 합성기를 사용하여

클로로메틸화된 수지상에서 실시예 1에서 묘사된 것과 같은 방법으로 수행한다.

TLC 및 HPLC를 사용한 결과, 본 펩티드는 실질상 순수하다는 것이 입증되었다.

H-His-D-DNMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Ser-Ser-Tyr-Arg-Arg-Ile-Leu-Gly-Gln-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-His-Glu-Ile-Nle-Asn-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-Arg-Ser-Arg-Phe-Asn-OH.

[실시예 4]

하기의 구조를 갖는 hGRF 유사체 단편 [D-NMA^{2}, Nle^{27}]-hGRF(1-32)-NH_2의 합성은 실시예 2에서와 같이 Beckman 990 펩티드 합성기를 사용하여 MBHA 수지 상에서 단계적 방법으로 수행한다.

TLC 및 HPLC를 사용한 결과, 본 유사체는 실질상 순수하다는 것이 입증되었다.

H-Tyr-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Ser-Arg-Gln-Gln-Gly-NH_2

본 합성을 2번 반복함으로서 [D-NMA^{2}, D-Met^{27}]-hGRF(1-32)-NH_2 와 [D-NMA^{2}, D-Leu^{23}, Nle^{27}]-hGRF(1-32)-NH_2를 생산할 수 있다.

[실시예 5]

하기의 구조를 갖는 hGRF 펩티드 단편 [D-NMA^{2}, Nle^{27}]-hGRF(1-29)-NH_2의 합성은 실시예 2에서와 같이 Beckman 990 펩티드 합성기를 사용하여 MBHA 수지 상에서 단계적 방법으로 수행한다.

TLC 및 HPLC를 사용한 결과, 본 펩티드는 실질상 순수하다는 것이 입증되었다.

H-Tyr-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Len-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Ser-Arg-NH_2

본 합성을 반복함으로서 [D-NMA^{2}, Nle^{27}]-hGRF(1-27)-NH_2를 생산할 수 있다.

[실시예 6]

하기의 구조를 갖는 [D-NMA^{2}, Nle^{27}]-rGRF(1-29)-NH_2의 합성은 실시예 2에서와 같이 Beckman 990 펩티드 합성기를 사용하여 MBHA 수지 상에서 단계적 방법으로 수행한다.

TLC 및 HPLC를 사용한 결과, 본 펩티드는 실질상 순수하다는 것이 입증되었다.

H-His-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Ser-Ser-Tyr-Arg-Arg-Ile-Leu-Gly-Gln-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-His-Glu-Ile-Nle-Asn-Arg-NH_2

본 합성을 반복함으로서 [D-NMA^{2}, D-Leu^{23},Nva^{27}]-rGRF(1-29)-NH_2를 생산할 수 있다.

[실시예 7]

하기의 구조를 갖는 [D-NMA^{2}, D-Glu^{25}, Nva^{27}]-rGRF(1-29)-NH_2의 합성은 실시예 2에서와 같이 Beckman 990 펩티드 합성기를 사용하여 MBHA 수지 상에서 단계적 방법으로 수행한다.

TLC 및 HPLC를 사용한 결과, 본 펩티드는 실질상 순수하다는 것이 입증되었다.

H-Tyr-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-D-Glu-Ile-Nle-Ser-Arg-NH_2

[실시예 8]

하기의 구조를 갖는 [D-NMA^{2}, D-Glu^{25}, Nva^{27}]-rGRF(1-29)-NH_2의 합성은 실시예 2에서와 같이 Beckman 990 펩티드 합성기를 사용하여 MBHA 수지 상에서 단계적 방법으로 수행한다.

TLC 및 HPLC를 사용한 결과, 본 펩티드는 실질상 순수하다는 것이 입증되었다.

H-His-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Ser-Ser-Tyr-Arg-Arg-Ile-Leu-Gly-Gln-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-His-D-Glu-Ile-Nva-Asn-Arg-NH_2

[실시예 9]

하기의 구조를 갖는 [D-Phe^{1}, D-NMA^{2}, D-Leu^{23}]-pGRF(1-44)-NH_2의 합성은, 미국특허 제4,292,313호 (Vale 등)에 기술된 바와 같이, Beckman 990 펩티드 합성기를 사용하여 MBHA 수지 상에서 단계적 방법으로 수행한다. TLC 및 HPLC를 사용한 결과, 본 펩티드는 실질상 순수하다는 것이 입증되었다.

H-D-Phe-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-D-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-Ser-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Glu-Gln-Gly-Ala-Arg-Val-Arg-Leu-NH_2

[실시예 10]

하기의 구조를 갖는 [pCl-Phe^{1}, D-NMA^{2}, D-$Leu^{17,23}$ Asp^{25}, Ile^{27}]-rGRF(1-43)-OH의 합성은 실시예 1에

묘사된 방법으로 Beckman 990 펩티드 합성기를 사용하여 클로로메틸화된 수지 상에서 단계적 방법으로 수행한다. TLC 및 HPLC를 사용한 결과, 본 펩티드는 실질상 순수하다는 것이 입증되었다.

H-pCl-Phe-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Ser-Ser-Tyr-Arg-Arg-Ile-Leu-Gly-Gln-D-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-D-Leu-His-Asp-Ile-Ile-Asn-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-Arg-Ser-Arg-Phe-Asn-OH

[실시예 11]

하기의 구조를 갖는 [D-NMA^{2}, D-Asp^{3,25}]-hGRF(1-32)-NH_2의 합성은 실시예 2에서와 같이 Beckman 990 펩티드 합성기를 사용하여 MBHA 수지 상에서 단계적 방법으로 수행한다. TLC 및 HPLC를 사용한 결과, 본 유사체는 실질상 순수하다는 것이 입증되었다.

H-Tyr-D-NMA-D-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-D-Asp-Ile-Met-Ser-Arg-Gln-Gln-Gly-NH_2

[실시예 12]

하기의 구조를 갖는 [D-Tyr^{1}, D-NMA^{2}, D-Asp^{3}, D-Asn^{8}, D-Tyr^{10},D-Ala^{15},D-Leu^{17,23}, D-Asp^{25}, D-Met^{27}]-hGRF(1-29)-NH_2의 합성은 실시예 2에서와 같이 Beckman 990 펩티드 합성기를 사용하여 MBHA 수지 상에서 단계적 방법으로 수행한다. TLC 및 HPLC를 사용한 결과, 본 유사체는 실질상 순수하다는 것이 입증되었다.

H-D-Tyr-D-NMA-D-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-D-Asn-Ser-D-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-D-Ala-Gln-D-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Lue-D-Leu-Gln-D-Asp-Ile-D-Met-Ser-Arg-NH_2

[실시예 13]

하기의 구조를 갖는 [D-His^{1}, D-NMA^{2}, D-Ser^{8}, D-Leu^{28} Nle^{27}]-rGRF(1-43)-OH의 합성은 실시예 1에 묘사된 방법으로 Beckman 990 펩티드 합성기를 사용하여 클로로메틸화된 수지 상에서 단계적 방법으로 수행한다.

TLC 및 HPLC를 사용한 결과, 본 펩티드는 실질상 순수하다는 것이 입증되었다.

H-D-His-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-D-Ser-Ser-Tyr-Arg-Arg-Ile-Leu-Gly-Gln-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-D-Leu-His-Glu-Ile-Nle-Asn-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-Arg-Ser-Arg-Phe-Asn-OH

[실시예 14]

하기의 구조를 갖는 rGRF 유사체 단편 [N^{a} MeTyr^{1}, D-NMA^{2}, D-Glu^{25}]-rGRF(1-29)-NH^{2}의 합성은 실시예 2에서와 같이 Beckman 990 펩티드 합성기를 사용하여 MBHA 수지 상에서 단계적 방법으로 수행한다. TLC 및 HPLC를 사용한 결과, 본 펩티드는 실질상 순수하다는 것이 입증되었다.

N^{a} MeTyr-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Ser-Ser-Tyr-Arg-Arg-Ile-Leu-Gly-Gln-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-His-D-Glu-Ile-Met-Asn-Arg-NH_2

[실시예 15]

하기의 구조를 갖는 [C^{a} MeLeu^{1}, D-NMA^{2}, D-Leu^{23}, D-Glu^{25}, Ala^{27}]-rGRF-[Val^{44}]-NH_2의 합성은 실시예 2에서와 같이 Beckman 990 펩티드 합성기를 사용하여 MBHA 수지 상에서 단계적 방법으로 수행한다. TLC 및 HPLC를 사용한 결과, 본 펩티드는 실질상 순수하다는 것이 입증되었다.

H-C^{a} MeLeu-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Ser-Ser-Tyr-Arg-Arg-Ile-Leu-Gly-Gln-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-D-Leu-His-D-Glu-Ile-Ala-Asn-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-Arg-Ser-Arg-Phe-Asn-Val-NH_2

[실시예 16]

하기의 구조를 갖는 [D-NMA^{2}, Nle^{27}]-pGRF(1-29)-NH_2의 합성은 미국특허 제4,292,313호(Vale 등)에 기술된 바와 같이 Beckman 990 펩티드 합성기를 사용하여 MBHA 수지 상에서 단계적 방법으로 수행한다. TLC 및 HPLC를 사용한 결과, 본 펩티드는 실질상 순수하다는 것이 입증되었다.

H-Tyr-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Ser-Arg-NH_2

[실시예 17]

하기의 구조를 갖는 [D-Tyr^{1}, D-NMA^{2}, D-Leu^{23}]-bGRF(1-44)-NH_2의 합성은 미국특허 제4,292,313호(Vale 등)에 기술된 바와 같이 Beckman 990 펩티드 합성기를 사용하여 MBHA 수지 상에서 단계적 방법으로 수행한다. TLC 및 HPLC를 사용한 결과, 본 펩티드는 실질상 순수하다는 것이 입증되었다.

H-D-Tyr-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-D-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-Asn-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-Gly-Ala-Arg-Val-Arg-Leu-NH_2

[실시예 18]

하기의 구조를 갖는 [D-NMA^{2}, Nle^{27}]-bGRF(1-29)-NH_2의 합성은 미국특허 제4,292,313호(Vale 등)에 기술된 바와 같이 Beckman 990 펩티드 합성기를 사용하여 MBHA 수지 상에서 단계적 방법으로 수행한다. TLC 및 HPLC를 사용한 결과, 본 펩티드는 실질상 순수하다는 것이 입증되었다.

H-Tyr-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Ley-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Asn-Arg-NH_2

[실시예 19]

하기의 구조를 갖는 [C^{a}MePhe^{1}, D-NMA^{2}, Val^{27}]-rGRF-[Leu^{44}]-NH_2의 합성은 실시예 2에서와 같이 Beckman 990 펩티드 합성기를 사용하여 MBHA 수지 상에서 단계적 방법으로 수행한다. TLC 및 HPLC를 사용한 결과, 본 펩티드는 실질상 순수하다는 것이 입증되었다.

H-C^{a}MePhe-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Ser-Ser-Tyr-Arg-Arg-Ile-Leu-Gly-Gln-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-His-Glu-Ile-Val-Asn-Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-Arg-Ser-Arg-Phe-Asn-Leu-NH_2

[실시예 20]

하기의 구조를 갖는 [D-Met1, D-NMA^{2}, Tyr^{18}]-bGRF(1-44)-NH_2의 합성은 미국특허 제4,292,313호(Vale 등)에 기술된 바와 같이 Beckman 990 펩티드 합성기를 사용하여 MBHA 수지 상에서 단계적 방법으로 수행한다. TLC 및 HPLC를 사용한 결과, 본 펩티드는 실질상 순수하다는 것이 입증되었다.

H-D-Met-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-Asn-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-Gly-Ala-Arg-Val-Arg-Leu-NH_2

[실시예 21]

하기의 구조를 갖는 [N^{a}MeHis^{1}, D-NMA^{2}, Nle^{27}]-pGRF(1-29)-NH_2의 합성은 미국특허 제4,292,313호(Vale 등)에 기술된 바와 같이 Beckman 990 펩티드 합성기를 사용하여 MBHA 수지 상에서 단계적 방법으로 수행한다.

TLC 및 HPLC를 사용한 결과, 본 펩티드는 실질상 순수하다는 것이 입증되었다.

H-N^{a}MeHis-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Ser-Arg-NH_2

[실시예 22]

하기의 구조를 갖는 hGRF 유사체 단편 [D-NMA^{2}, Leu^{27}, Asn^{28}]-hGRF(1-32)-NH_2의 합성은 실시예 2에서와 같이 Beckman 990 펩티드 합성기를 사용하여 MBHA 수지 상에서 단계적 방법으로 수행한다. TLC 및 HPLC를 사용한 결과, 본 유사체는 실질상 순수하다는 것이 입증되었다.

H-Tyr-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Leu-Asn-Arg-Gln-Gln-Gly-NH_2

본 합성을 2번 반복함으로서 [D-NMA^{2}, Nva^{27}]-hGRF(1-32)-NH_2와 [D-NMA^{2}, Ile^{13}, Nle^{27}]-hGRF(1-32)-NH_2를 생산할 수 있다.

[실시예 23]

하기의 구조를 갖는 [D-NMA^{2}, Lys^{12}, Asn^{28}]-rGRF(1-29)-NH_2의 합성은 실시예 2에서와 같이 Beckman 990 펩티드 합성기를 사용하여 MBHA 수지 상에서 단계적 방법으로 수행한다.

TLC 및 HPLC를 사용한 결과, 본 펩티드는 실질상 순수하다는 것이 입증되었다.

H-His-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Ser-Ser-Tyr-Arg-Lys-Ile-Leu-Gly-Gln-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-His-Glu-Ile-Nle-Asn-Arg-NH_2

본 합성을 반복함으로서 [D-NMA^{2}, Val^{13}, Ser^{18}]-rGRF(1-29)-NH_2를 생산할 수 있다.

[실시예 24]

하기의 구조를 갖는 hGRF 유사체 단편 [D-NMA^{2}, Arg^{12}, Ile^{27}]-hGRF(1-29)-NH_2의 합성은 실시예 2에서와 같이 Beckman 990 펩티드 합성기를 사용하여 MBHA 수지상에서 단계적 방법으로 수행한다. TLC 및 HPLC를 사용한 결과, 본 팹티드는 실질상 순수하다는 것이 입증되었다.

H-Tyr-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Try-Arg-Arg-Val-Leu-Gly-Gln-Len-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Ile-Ser-Arg-NH_2

[실시예 25]

하기의 구조를 갖는 [D-Phe^{1}, D-NMA^{2}, D-Ala^{15}, D-Met^{27}]-hGRF(1-29)-NH_2의 합성은 실시예 2에서와 같이 Beckman 990 펩티드 합성기를 사용하여 MBHA 수지 상에서 단계적 방법으로 수행한다. TLC 및 HPLC를 사용한 결과, 본 유사체는 실질상 순수하다는 것이 입증되었다.

H-D-Phe-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-D-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-D-Met-Ser-Arg-NH_2

[실시예 26]

하기의 구조를 갖는 [D-NMA^{2}, His^{24}, D-Asp^{25}]-hGRF(1-32)-NH_2의 합성은 실시예 2에서와 같이 Beckman 990 펩티드 합성기를 사용하여 MBHA 수지 상에서 단계적 방법으로 수행한다. TLC 및 HPLC를 사용한 결과, 본 유사체는 실질상 순수하다는 것이 입증되었다.

H-Tyr-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-His-D-Asp-Ile-Met-Ser-Arg-Gln-Gln-Gly-NH_2

[실시예 27]

하기의 구조를 갖는 [N^{a} MeHis^{1}, D-NMA^{2}, D-Asp^{25}]-rGRF(1-29)-NH_2의 합성은 실시예 2에서와 같이 Beckman 990 펩티드 합성기를 사용하여 MBHA 수지 상에서 단계적 방법으로 수행한다. TLC 및 HPLC를 사용한 결과, 본 펩티드는 실질상 순수하다는 것이 입증되었다.

N^{a} MeHis-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Ser-Ser-Tyr-Arg-Arg-Ile-Leu-Gly-Gln-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-His-D-Asp-Ile-Met-Asn-Arg-NH_2

[실시예 28]

하기의 구조를 갖는 [D-His^{1}, D-NMA^{2}, D-Asn^{8}, Nle^{27},Ser^{34},Ala^{40}]-rGRF(1-43)-OH의 합성은 실시예 1에 묘사된 방법으로 Beckman 990 펩티드 합성기를 사용하여 클로로메틸화된 수지상에서 단계적 방법으로 수행한다. TLC 및 HPLC를 사용한 결과, 본 펩티드는 실질상 순수하다는 것이 입증되었다.

H-D-His-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-D-Asn-Ser-Tyr-Arg-Arg-Ile-Leu-Gly-Gln-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-His-Glu-Ile-Nle-Asn-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Ser-Asn-Gln-Glu-Gln-Arg-Ala-Arg-Phe-Asn-OH

[실시예 29]

하기의 구조를 갖는 [D-Ala^{2}, D-Asp^{3}, D-Arg^{29}]-hGRF(1-32)-NH_2의 합성은 실시예 2에서와 같이 Beckman 990 펩티드 합성기를 사용하여 MBHA 수지 상에서 단계적 방법으로 수행한다. TLC 및 HPLC를 사용한 결과, 본 유사체는 실질상 순수하다는 것이 입증되었다.

H-Tyr-D-Ala-D-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-Ser-D-Arg-Gln-Gln-Gly-NH_2

[실시예 30]

하기의 구조를 갖는 [D-Tyr^{1}, D-NMA^{2}, D-Asp^{3,25}, D-Asn^{8}, D-Tyr^{10}, D-Ala^{15}, D-Len^{14,17,23},D-Met^{27},D-Arg^{29}]-hGRF(1-29)-NH_2의 합성은 실시예 2에서와 같이 Beckman 990 펩티드 합성기를 사용하여 MBHA 수지 상에서 단계적 방법으로 수행한다. TLC 및 HPLC를 사용한 결과, 본 유사체는 실질상 순수하다는 것이 입증되었다.

H-D-Tyr-D-NMA-D-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-D-Asn-Ser-D-Tyr-Arg-Lys-Val-D-Leu-D-Ala-Gln-D-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-D-Leu-Gln-D-Asp-Ile-D-Met-Ser-D-Arg-NH_2

[실시예 31]

하기의 구조를 갖는 [D-His^{1}, D-NMA^{2}, D-Ser^{8}, d-Leu^{14}, Nle^{27}]-rGRF(1-43)-$NHCH_2CH_3$의 합성은 실시예 1에 묘사된 방법으로 Beckman 990 펩티드 합성기를 사용하여 클로로메틸화된 수지상에서 단계적 방법으로 하고 에틸아민을 사용하여 수지로부터 제거함으로 치환 아미드 펩티드를 형성한다. TLC 및 HPLC를 사용한 결과, 본 펩티드는 실질상 순수하다는 것이 입증되었다.

H-D-His-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-D-Ser-Ser-Tyr-Arg-Arg-Ile-D-Leu-Gly-Gln-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-His-Glu-Ile-Nle-Asn-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-Arg-Ser-Arg-Phe-Asn-$NHCH_2CH_3$

[실시예 32]

하기의 구조를 갖는 rGRF 유사체 단편 즉 [N^{a} MeTyr^{1}, D-Leu^{14}, D-Glu^{25}]-rGRF(1-27)-NH_2의 합성은 실시예 2에서와 같이 Beckman 990 펩티드 합성기를 사용하여 MBHA 수지 상에서 단계적 방법으로 수행한다. TLC 및 HPLC를 사용한 결과, 본 펩티드는 실질상 순수하다는 것이 입증되었다.

N^{a} MeTyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Ser-Ser-Tyr-Arg-Ile-D-Leu-Gly-Gln-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-

Leu-His-D-Glu-Ile-Met-NH_2

[실시예 33]

하기의 구조를 갖는 [D-Tyr^{1}, D-NMA^{2}, D-Leu^{14}, D-Arg^{29}]-pGRF(1-44)-NH_2의 합성은 미국특허 제 4,292,313호(Vale 등)에 기술된 바와같이 Beckman 990 펩티드 합성기를 사용하여 MBHA 수지 상에서 단계적 방법으로 수행한다.

TLC 및 HPLC를 사용한 결과, 본 펩티드는 실질상 순수하다는 것이 입증되었다.

H-D-Tyr-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-D-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-Ser-D-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-Gly-Ala-Arg-Val-Arg-Leu-NH_2

[실시예 34]

하기의 구조를 갖는 [C^{a} MeLeu^{1}, D-NMA^{2}, D-Leu^{14}, D-Glu^{25}, Ile^{27}]-rGRF(1-27)-NH_2의 합성은 실시예 2에서와 같이 Beckman 990 펩티드 합성기를 사용하여 MBHA 수지 상에서 단계적 방법으로 수행한다.

TLC 및 HPLC를 사용한 결과, 본 펩티드는 실질상 순수하다는 것이 입증되었다.

H-C^{a} MeLeu-D-NHA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Ser-Ser-Tyr-Arg-Arg-Ile-D-Leu-Gly-Gln-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-His-D-Glu-Ile-Ile-NH_2

[실시예 35]

하기의 구조를 갖는 [D-Tyr^{1}, D-NMA^{2}, D-Leu^{14},D-Arg^{29},Ala^{42}]-bGRF(1-44)-NH_2의 합성은 미국특허 제 4,292,313호(Vale 등)에 기술된 바와같이 Beckman 990 펩티드 합성기를 사용하여 MBHA 수지 상에서 단계적 방법으로 수행한다. TLC 및 HPLC를 사용한 결과, 본 펩티드는 실질상 순수하다는 것이 입증되었다.

H-D-Tyr-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-D-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-Asn-D-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-Gly-Ala-Arg-Ala-Arg-Leu-NH_2

[실시예 36]

하기의 구조를 갖는 [D-NMA^{2}, Nle^{27}, D-Arg^{29}]-pGRF(1-29)-NH_2의 합성은 미국특허 제4,292,313호(Vale 등)에 기술된 바와같이 Beckman 990 펩티드 합성기를 사용하여 MBHA 수지 상에서 단계적 방법으로 수행한다. TLC 및 HPLC를 사용한 결과, 본 펩티드는 실질상 순수하다는 것이 입증되었다. 본 펩티드를 물에 용해시키고 1N 초산을 첨가함으로 그 초산염이 제조된다. 생성된 용액을 동결 건조시킴으로서 초산염이 산출된다.

H-Tyr-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Ser-D-Arg-NH_2

[실시예 37]

하기의 구조를 갖는 hGRF 유사체[D-NMA^{2}, Nle^{27}, D-Arg^{29}]-hGRF(1-29-NH_2의 합성은 실시예 2에서와 같이 Beckman 990 펩티드 합성기를 사용하여 MBHA 수지 상에서 단계적 방법으로 수행한다. TLC 및 HPLC를 사용한 결과, 본 유사체는 실질상 순수하다는 것이 입증되었다.

H-Try-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Try-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Ser-D-Arg-NH_2

본 합성을 반복함으로써 [D-NMA^{2}, D-Leu^{14}, Nle^{27}, D-Arg^{29}]-hGRF(1-32)-NH_2를 생산할 수 있다.

[실시예 38]

하기의 구조를 갖는 [D-Leu^{14}, Nle^{27}]-rGRF(1-29)-NH_2의 합성은 실시예 2에서와 같이 Beckman 990 펩티드 합성기를 사용하여 MBHA 수지 상에서 단계적 방법으로 수행한다. TLC 및 HPLC를 사용한 결과, 본 펩티드는 실질상 순수하다는 것이 입증되었다.

H-His-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Ser-Ser-Tyr-Arg-Ile-D-Leu-Gly-Gln-Leu-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-His-Glu-Ile-Nle-Asn-Arg-NH_2

본 합성을 반복함으로써 [D-NMA^{2}, D-Leu^{14}, Nle^{27}]-rGRF(1-29)-NH_2를 생산할 수 있다.

[실시예 39]

하기의 구조를 갖는 hGRF 유사체[D-NMA^{2}, Nle^{27}, Asn^{28}]-hGRF(1-29)-NH_2의 합성은 실시예 2에서와 같이 Beckman 990 펩티드 합성기를 사용하여 MBHA 수지 상에서 단계적 방법으로 수행한다. TLC 및 HPLC를 사용한 결과, 본 펩티드는 실질상 순수하다는 것이 입증되었다.

H-Tyr-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Asn-Arg-NH_2

[실시예 40]

하기의 구조를 갖는 [D-Ala^2, D-Glu^{25}, D-Arg^{29}]-hGRF(1-29)-NH_2의 합성은 실시예 2에서와 같이 Beckman 990 펩티드 합성기를 사용하여 MBHA 수지 상에서 단계적 방법으로 수행한다. 본 펩티드를 수지로 부터 제거하여 탈보호되면 동결건조에 앞어 1N 초산으로 처리하여서 그 초산염을 제조한다. TLC 및 HPLC를 사용한 결과, 본 펩티드는 실질상 순수하다는 것이 입증되었다.

H-Tyr-D-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-D-Ile-Nle-Ser-D-Arg-NH_2

[실시예 41]

하기의 구조를 갖는 [Nle^{27}, D-Arg^{29}]-rGRF(1-29)-NH_2 의 합성은 실시예 2에서와 같이 Beckman 990 펩티드 합성기를 사용하여 MBHA 수지 상에서 단계적 방법으로 수행한다. TLC 및 HPLC를 사용한 결과, 본 펩티드는 실질상 순수하다는 것이 입증되었다.

H-His-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Ser-Ser-Tyr-Arg-Arg-Ile-Leu-Gly-Gln-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-His-Glu-Ile-Nle-Asn-D-Arg-NH_2

[실시예 42]

하기의 구조를 갖는 [pCl-Phe^1, D-NMA^2, D-Leu^{14}, Nle^{27}, D-Arg^{29}]-rGRF(1-43)-OH의 합성은 실시예 1에 묘사된 방법으로 Beckman 990 펩티드 합성기를 사용하여 클로로메틸화된 수지상에서 단계적 방법으로 수행한다. TLC 및 HPLC를 사용한 결과, 본 펩티드는 실질상 순수하다는 것이 입증되었다.

H-pCl-Phe-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Ser-Ser-Tyr-Arg-Arg-Ile-D-Leu-Gly-Gln-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-His-Asp-Ile-Nle-Asn-D-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-Arg-Ser-Arg-Phe-Asn-OH

[실시예 43]

하기의 구조를 갖는 hGRF 유사체 단편 [D-NMA^2, D-Tyr^{10}, Nle^{27}]-hGRF(1-29)-NH_2 의 합성은 실시예 2에서와 같이 Beckman 990 펩티드 합성기를 사용하여 MBHA 수지 상에서 단계적 방법으로 수행한다. TLC 및 HPLC를 사용한 결과, 본 펩티드는 실질상 순수하다는 것이 입증되었다.

H-Tyr-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-D-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Ser-Arg-NH_2

[실시예 44]

하기의 구조를 갖는 hGRF 유사체 단편[D-NMA^2, Nle^{27}]-hGRF(1-29)-NHE_t 의 합성은 실시예 1에서와 같이 Beckman 990 펩티드 합성기를 사용하여 클로로메틸화된 수지상에서 단계적 방법으로 수행한다. 본 펩티드를 에틸아민으로 처리하여 가암모니아분해를 하여 수지로 부터 제거한다. TLC 및 HPLC를 사용한 결과, 본 펩티드는 실질상 순수하다는 것이 입증되었다.

H-Tyr-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Ser-Arg-$NHCH_2CH_3$

[실시예 45]

하기의 구조를 갖는 [D-Leu^{14}, Nle^{27}]-rGRF(1-29)-NH_2 의 합성은 실시예 2에서와 같이 Beckman 990 펩티드 합성기를 사용하여 MBHA 수지 상에서 단계적 방법으로 수행한다. TLC 및 HPLC를 사용한 결과, 본 펩티드는 실질상 순수하다는 것이 입증되었다.

H-His-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Ser-Ser-Tyr-Arg-Ile-D-Leu-Gly-Gln-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-His-Glu-Ile-Nle-NH_2

[실시예 46]

하기의 구조를 갖는 hGRF 유사체 단편 [D-Tyr^1, D-NMA^2, Nle^{27}, D-Arg^{29}]-hGRF(1-29)-NH_2 의 합성은 실시예 2에서와 같이 Beckman 990 펩티드 합성기를 사용하여 MBHA 수지 상에서 단계적 방법으로 수행한다. TLC 및 HPLC를 사용한 결과, 본 펩티드는 실질상 순수하다는 것이 입증되었다.

H-D-Tyr-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Ser-D-Arg-NH_2

본 합성을 2번 반복함으로써 [Met^1, D-NMA^2,Nle^{27}]-hGRF(1-27)-NH_2를 생산할 수 있다.

[실시예 47]

하기의 구조를 갖는 hGRF 유사체 단편 [D-N^a MeTyr, D-NMA^2, Nle^{27}]-hGRF(1-29)-NH_2 의 합성은 실시예

2에서와 같이 Beckman 990 펩티드 합성기를 사용하여 MBHA 수지 상에서 단계적 방법으로 수행한다. TLC 및 HPLC를 사용한 결과, 본 펩티드는 실질상 순수하다는 것이 입증되었다.

H-D-N^{a}MeTyr-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Ser-Arg-NH_2

[실시예 48]

하기의 구조를 갖는 hGRF 유사체 단편 [His^{1}, D-NMA^{2}, Nle^{27}]-hGRF(1-29)-NH_2의 합성은 실시예 2에서와 같이 Beckman 990 펩티드 합성기를 사용하여 MBHA 수지 상에서 단계적 방법으로 수행한다. TLC 및 HPLC를 사용한 결과, 본 펩티드는 실질상 순수하다는 것이 입증되었다.

H-His-D-NMA-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Ser-Arg-NH_2

본 합성을 2번 반복함으로써 [His^{1},Nle^{27}, D-Arg^{29}]-hGRF(1-27)-NH_2를 생산할 수 있다.

본 실시예에서 제조된 합성 펩티드는 시험관내 분석시에 합성 hpGRF(1-40)-OH와 비교되며, 더 큰 GH 분비 효능 및 유사한 고유활성을 나타낸다는 것이 발견되었다. 이들 합성 펩티드 모두는 생물학적 활성이 있으며, 뇌하수체에 의한 GH의 분비를 자극시키는데 유용하다고 간주된다.

성장 로르몬의 분비를 증진시키기 위한 대표적인 합성 펩티드의 상대적 효력을 측정하기 위해서, 합성된 대표적 유사체 등몰 농도와 나란히 비교되는 표준물질로서 합성 hpGRF(1-40)-OH를 사용하여 시험관내 분석을 실시한다. 3-5일전에 분리된 생쥐의 뇌하수체 세포가 포함된 배양액을 사용한다. 그러한 배양액은 성장 호르몬의 분비가 가장 적당하다고 생각되며, Vale 등의 저서[내분비학 91, 562-572(1972) ; 보다 자세하게는, 내분비학 112, 1553 -1555(1983)]에 기재된 일반적인 방법으로 비교 시험할때 사용된다. 시험된 물질을 사용하여 3-4시간동안 배양하고, 배지의 부분표본을 분리해내어 잘 규명된 방사면역 분석시험에 의해 면역활성 GH(ir GH)내의 그들의 함량을 측정한다.

등몰 농도에 대한 본 비교시험의 결과가 하기의 표 Ⅰ에 나와있다.

[표 Ⅰ]

펩 티 드	비 교 %
hGRF(1-40)-OH (본 시험의 표준)	100%
[D-NMA^{2}, Nle^{27}]-hGRF(1-29)-NH_2	1330%
[D-NMA^{2}, Nle^{27}]-hGRF(1-27)-NH_2	150%
[D-NMA^{2}, Nle^{27}]-hGRF(1-29)-NHEt	1130%
[D-NMA^{2}, Nle^{27}, Asn^{28}]-hGRF(1-29)-NH_2	520%
[D-Leu^{14}, Nle^{27}]-rGRF(1-29)-NH_2	120%
[Nle^{27}, D-Arg^{29}]-rGRF(1-29)-NH_2	386%
[D-NMA^{2}, Nle^{27}]-rGRF(1-29)-NH_2	900%
[D-NMA^{2}, D-Tyr^{10}, Nle^{27}]-hGRF(1-29)-NH_2	270%
[D-NMA^{2}, Nle^{27}, D-Arg^{29}]-hGRF(1-29)-NH_2	580%
[D-Tyr^{1}, D-NMA^{2}, Nle^{27}, D-Arg^{29}]-hGRF(1-29)-NH_2	60%
[D-N^{a}MeTyr^{1}, D-NMA^{2}, Nle^{27}]-hGRF(1-29)-NH_2	30%
[His^{1}, D-NMA^{2}, Nle^{27}]-hGRF(1-29)-NH_2	260%

이들 합성 펩티드의 시험관내 분석은, 그들 대부분의 생물학적 효능이 hpGRF(1-40)-OH에 의한 효능보다 놀랍게도 더 크다는 것을 입증해주는데, 예컨대, [D-NMA^{2},Nle^{27}]-hGRF(1-29)-NH_2의 최소 유효 농도는 약 1 피코몰 농도이다.

성장 호르몬 분비에 대한 시험관내 시험 이외에 생체내 시험에서는 우레탄으로 마취시킨 수컷쥐의 정맥내로 본 합성 펩티드를 주사하고, 본 펩티드의 외생적 GRF에 대한 반응을 폐지시키지 않으면서 자발적 GH분비를 억제시키는 것을 측정한다. 주사하기 바로 직전 및 주사한 10분후, 30분후 및 90분후에 혈액 샘플을 취한다. 방사면역 분석시험에 의해 측정된 GH 혈중량은, 합성[D-NMA^{2}, Nle^{27}]-hGRF(1-29)-NH_2가, 뇌하수체 GH의 혈중량에 대하여, hGRF(1-40)-OH보다 6배정도 더 큰 효능이 있음을 입증해 준다.(IV를 주사한지 10분후와 30분후에 측정했을때). GH의 분비를 탐지하기 위해 효과적이라고 알려진 다른 공지의 GRF 생체내 시험을 이용하여 이러한 결과를 확인한다. GH의 분비를 야기시키는데 효과적이라고 생각되는 투여량은, 체중 1kg당 이들 펩티드 약 50나노그람-5-마이크로그람의 범위이다. 시험관내에서 표준물질과 거의 동일하거나 약간 더 낮은 생물학적 효능을 나타내는 몇몇 펩티드는, 생체내 시험에서 매우 큰 효능을 나타낸다.

그러한 합성 hGRF 유사체 및, (아마도)rGRF,bGRF와 pGRF 유사체는, GH 생산율을 높이고자하는 인간 환자에게 적용될때 유용해야 한다. 그같은 유사체에 의해 GH 분비를 자극하는 것은, 내생적 GRF의

생산부족으로 인해 GH가 완전히 또는 비교적 부족한 환자에게 있어 중요하다.

게다가, 증가된 GH 분비 및 그에 수반되는 성장 증가는 정상적인 GH 값을 갖는 인간 또는 동물내에서 얻어질 것이라 생각된다.

더우기, 그러한 유사체의 투여에 의해서 신체의 지방 성분을 개조하고, 다른 GH-의존 대사과정, 면역과정 및 발육과정을 변경시켜야 하다. 예를들어, 이들 유사체는 화상을 입은 후와 같은 상황하의 인간내에서 동화 작용을 자극하는 수단으로 유용할 수 있다. 또다른 예로서, 이들 유사체는 성장 속도를 증가시키기 위해, 또한 유효량의 펩티드를 공급함으로써 얻어지는 단백질 : 지방의 비율을 증가시키기 위해, 상업적인 온혈동물(예 : 닭,칠면조,돼지,염소,축우 및 양)에게 투여될 수 있으며 물고기 및 다른 냉혈 해상동물(예 : 바다 거북 및 뱀장어)과 양서류를 기르는 수중 배양시 사용될 수 있다.

인간에게 투여할 경우, 이들 합성 펩티드의 순도는 적어도 약 93%, 바람직하게는 적어도 98%이어야 한다. 이러한 적용 목적상의 순도란, 명시된 중량%의 모든 펩티드 및 존재하는 펩티드 단편을 구성하는 계획된 펩티드를 뜻한다. 성장을 증진시키고 지방 함량을 감소시키기 위하여, 그러한 합성 펩티드를 상업적 동물 및 그외의 동물에게 투여하는 경우에는, 약 5% 정도의 낮은 순도이거나, 혹은 0.01% 정도로 낮은 순도일지라도 가능하다.

이들 합성 펩티드 또는 제약 조성물의 생성을 위해 제약상 또는 수의학상 허용가능한 담체와 결합된 그의 무독성염을, 인간을 포함한 동물에게 정맥내, 피하, 근육내, 피부를 통해(예 : 비강내)서 투여하거나 또는 구강 투여할 수 있다. 치료받는 숙주가 치료를 원하는 곳에서 GH 분비를 자극시키기 위해, 의사의 결정에 따라 투여방식을 채택할 수 있다. 필요한 용량은 특정 치료조건, 상태의 심각성 및 원하는 치료의 지속기간에 따라 여러가지로 할수 있다.

그러한 펩티드는 때로는 산부가염과 같은 무독성염이나, 예컨대 아연, 철등과의 금속 착염의 형태로 투여된다(이들은 이러한 적용에 위한 염이라고 생각됨).

그러한 산부가염의 예로는 염화수소산염, 브롬화수소산염, 황산염, 인산염, 말레이산염, 초산염, 구연산염, 벤조산염, 숙신산염, 말산염, 아스코르빈산염, 주석산염등이 있다. 활성 성분이 정제 형태로 경구 투여될 경우에는, 정제내에, 결합제(예 : 트라가칸트, 옥수수전분 또는 젤라틴) ; 붕해제(예 : 알긴산) ; 윤활제(스테아리산마그네슘)를 첨가할 수 있다. 액체 형태로 투여해야할 필요가 있을 경우에는 감미제 및/또는 향미제가 사용될 수 있으며, 등장 식염, 인산 완충액내에서 정맥내 투여를 할수 있다.

본 팹티드는 의사의 지시에 따라 이간에게 투여해야 하며, 제약 조성물은 펩티드와 함께 통상적인 고체나 액체의 제약상 허용 가능한 담체를 함유하는 것이 보통이다. 비경구적 용량은 숙주의 체중 1kg당 펩티드 약 0.01-1 마이크로그람의 범위로 하는 것이 보통이다.

현재 본 발명자들에게 가장 최상의 방식이라고 알려진 바람직한 구체예에 따라 본 발명을 기술하였으나, 청구범위에 기재된 본 발명의 범주내에서 여러가지 변화와 수정을 가할 수 있다는 것을 당업자라면 잘 알수 있을 것이다. 예를들어, 펩티드 사슬내의 변경(특히, 펩티드의 카르복실 말단에서부터 삭제하여 위치-27정도까지 연장시키는 것)은, 펩티드의 생물학적 효력 부위를 전부 또는 매우 많이 보유하는 펩티드 또는 펩티드 단편을 만들기 위해 지금까지 공지된 실험법에 따라 이루어질 수 있는데, 그러한 펩티드는 본 발명의 범주내의 것이라고 간주된다. 더우기, 한쪽 말단 또는 약쪽 말단에 첨가를 하거나/또는 팹티드는 본 발명의 범주내의 것이라고 간주된다. 더우기, 한쪽 말단 또는 약쪽 말단에 첨가를 하거나/또는 펩티드 화학 분야에 공지된 바와같이 자연발생 잔기 대신 그에 상당하는 잔기를 사용함으로써, 본 발명의 범주 내에서, 실질적인 효력 부위를 하나 이상 갖는 본 플리펩티드의 다른 유사체를 제조한다. 더우기, C-말단에 바람직한 $-NH_2$ 기를 만들기 위해서 현행 기술 수준에 따라 변화를 가할 수 있는데, 예컨대, C-말단에 있는 아미노산 잔기의 카르복실 성분은 -COOR, -CRO, -CONHNHR, -CON(R)(R') 또는 $-CH_2$ OR(여기서, R과 R'은 저급알킬, 플루오로저급알킬 또는 수소)와 같은 기일 수 있다. 이와같은 변화는 본 발명의 범주내의 것이므로, 이로 인해서 동등한 합성 펩티드가 생성된다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

하기 구조식(Ⅰ)의 합성 펩티드 또는 그의 무독성염 : R_1-D NMA-R_3-Ala-Ile-Phe-Thr-R_8-Ser-R_{10}-Arg-R_{12}-R_{13}-R_{14}-R_{15}-Gln-R_{17}-R_{18}-Ala-Arg-Lys-Leu-R_{23}-R_{24}-R_{25}-Ile-R_{27}-R_{28}-R_{29}-Gln-Gln-Gly-Glu-R_{34}-Asn-Gln-Glu-R_{38}-R_{39}-R_{40}-Arg-R_{42}-R_{43}-R_{44} (I) 상기식에서, R_1 은 C^aMe 또는 N^aMe 치환체를 갖거나 또는 비치환된 Tyr,D-Tyr,Met,Phe,D-Phe,pCl-Phe,Leu,His 도는 D-His ; R_3는 Asp 또는 D-Asp; R_8 은 Ser,Asn,D-Ser 또는 D-Asn ; R_{10}은 Tyr 또는 D-Tyr ; R_{12}는 Arg 또는 Lys ; R_{13}은 Ile 또는 Val ; R_{14}는 Len 또는 D-Leu ; R_{15}은 Gly 또는 D-Ala ; R17은 Leu 또는 D-Leu ; R_{18}은 Tyr 또는 Ser ; R_{23}은 Leu 또는 D-Leu ; R_{24}는 His 또는 Gln ; R_{25}는 Glu, Asp, D-Glu 또는 D-Asp ; R_{27}은 Met, D-Met, Ala, Nle,Ile, Leu, Nva 또는 Val ; R_{28}은 Asn 또는 Ser ; R_{29}는 Arg또는 D-Arg ; R_{34}는 Arg 또는 Ser ; R_{38}은 Gln 또는 Arg ; R_{39}는 Arg 또는 Gly ; R_{40}은 Ser 또는 Ala ; R_{42}는 Phe, Ala 또는 Val ; R_{43}은 Asn 또는 Arg ; R_{44}는 천연 아미노산이고 ; 단, R_{28} 부터 R_{44}까지(R_{28},R_{44} 포함)의 어느 잔기 또는 그 모두가 삭제될 수 있다.

청구항 2

제1항에 있어서, R_{29}가 D-Arg인 펩티드.

청구항 3

제1항에 있어서, R_{14}가 D-Leu인 펩티드.

청구항 4

제1항에 있어서, R_{25}가 D-Glu인 펩티드.

청구항 5

제1항에 있어서, R_{27}가 Nle인 펩티드.

청구항 6

제1항에 있어서, R_{17}가 D-Leu인 펩티드.

청구항 7

제1항에 있어서, R_{25}가 D-Asp인 펩티드.

청구항 8

제1항에 있어서, R_{17}가 D-Leu,R_{23}이 D-Leu,R_{25}가 Asp,R_{27}이 Nle이고 잔기 30에서 부터 44까지는 삭제된 펩티드.

청구항 9

동물내에서의 GH 분비 자극용 제약 조성물로서 제1-8항의 어느 하나에 청구된 펩티드 또는 그의 무독성염과 제약상 또는 수의학상 허용가능한 액체 또는 고체 담체로 구성되는 조성물.