

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

A61K 38/25

[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 91102730.0

[45]授权公告日 2001 年 5 月 30 日

[11]授权公告号 CN 1066345C

[22]申请日 1991.4.23 [24]颁证日 2001.2.3
[21]申请号 91102730.0
[30]优先权
[32]1990.4.24 [33]US [31]513,730
[73]专利权人 伊莱利利公司
地址 美国印第安纳州
[72]发明人 杰拉尔德·S·布鲁克
理查德·D·迪马尔基
马克·L·海曼 熊汉生
戴维·L·基迈利
丹尼斯·P·史密夫
审查员 潘爱群

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 曹恒兴

权利要求书 3 页 说明书 40 页 附图页数 2 页

[54]发明名称 生长激素释放因子类似物
[57]摘要

本发明提供了新的生长激素释放因子(GRF)类似物,还提供了这些分子经过化学修饰的编码 GRF 类似物的 DNA 化合物。有些多肽化合物能够通过大肠杆菌产生化合物,从而获得高产化合物。本发明还提供了药物组合物和诱发生长激素释放的方法。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种制备药物组合物的方法，该方法包括将一种多肽化合物与一种或多种药物赋形剂相混合，其中所述多肽化合物具有下式：

A-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-R-Tyr-
5 10

Arg-B-Val-Leu-C-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-D-Leu-Leu-
15 20

Gln-Asp-Ile-E-Asn-Arg-X;
25

式中 A 是 脱NH₂-Tyr, Ala-Tyr, Gln-Tyr, Gly-Tyr, His-Tyr, Met-Tyr, Phe-Tyr, Pro-Tyr, Ser-Tyr, Ala-Ala-Tyr, Arg-Ala-Tyr, Asp-Ala-Tyr, Phe-Ala-Tyr, Pro-Ala-Tyr, Pro-Pro-Tyr, Met-Ala-Tyr, Met-Arg-Tyr, Met-Asp-Tyr, Met-Leu-Tyr, Met-Pro-Tyr, Met-Ser-Tyr, Met-Ala-Ala-Tyr, Met-Arg-Pro-Tyr, Met-Asp-Pro-Tyr, Met-Gly-Pro-Tyr, Met-Phe-Pro-Tyr, 和 Met-Ser-Pro-Tyr; B 是 Arg 或 Lys; C 是 Gly, Ala, Leu, Val, Ile, 或 Thr; D 是 Arg 或 Lys, E 是 Met, Val, Leu, 或 Ser;

R是Asn或Ser;

X是一条能在大肠杆菌中获得高水平表达的足够长的氨基酸链;和

0、1或1个以上的具有游离氨基的氨基酸 被化学修饰。

2. 按权利要求 1 的方法, 其中 A 是 Ala-Tyr。

3. 按权利要求 1 的方法, 其中 A 是 Pro-Tyr。

4. 按权利要求 1 的方法, 其中 A 是脱-NH₂-Tyr。

5. 按权利要求 1 的方法, 其中 C 是 Thr。

6. 按权利要求 1 的方法, 其中 X 是

Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-Gly-Ala-Lys-Val-
 Arg-Leu-Gly-Arg-Gln-Val-Asp-Ser-Leu-Trp-Ala-Glu-Gln-
 Lys-Gln-Leu-Glu-Leu-Glu-Ser-Ile-Leu-Val-Ala-Leu-Leu-
 Gln-Lys-His-Ser-Arg-Asn-Ser-Gln-Gly.

7. 按权利要求 1 的方法, 其中多肽化合物是:

Ala-Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-
 0 5 10
 Leu-Thr-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Leu-
 15 20 25
 Asn-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-Gly-Ala-Lys-
 30 35 40
 Val-Arg-Leu-Gly-Arg-Gln-Val-Asp-Ser-Leu-Trp-Ala-Glu-Gln-
 45 50 55
 Lys-Gln-Leu-Glu-Leu-Glu-Ser-Ile-Leu-Val-Ala-Leu-Leu-Gln-
 60 65
 Lys-His-Ser-Arg-Asn-Ser-Gln-Gly.
 70 75

8. 按权利要求 1 的方法, 其中多肽化合物是下式化合物和药物上可接受的固体或液体载体:

脱NH₂-Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Asn-Tyr-Arg-Arg-Val-
 5 10
 Leu-Thr-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Arg-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Leu-
 15 20 25
 Asn-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-Gly-Ala-Arg-
 30 35 40
 Val-Arg-Leu-Gly-Arg-Gln-Val-Asp-Ser-Leu-Trp-Ala-Asp-Gln-
 45 50 55
 Arg-Gln-Leu-Ala-Leu-Glu-Ser-Ile-Leu-Ala-Thr-Leu-Leu-Gln-
 60 65
 Glu-His-Arg-Asn-Ser-Gln-Gly,
 70

9. 按权利要求 1 的方法， 其中具有游离氨基的至少 1 个氨基酸在该氨基上被由 0、 1 或 1 个以上羟基取代的 $C_1 - C_6$ 直链或支链烷基链取代。

10. 按权利要求 9 的药物组合物， 其中至少 1 个羟烷基是 2, 3-二羟丙基。

生长激素释放因子类似物

生长激素释放因子(GRF)最初是由人的胰腺肿瘤中分离得到的44个氨基酸肽(Guillemin et al., Science 218:585, 1982)。由于GRF能刺激内源生长激素的释放,所以它是一种有用的肽。因其分子量较小,所以很难通过重组方法大量生产。

以前试图在大肠杆菌中表达GRF所作的种种尝试在两个方面都不能令人满意。直接表达则产生的蛋白质的量很少(美国专利4728609);大量表达则只能与另一多肽融合才能获得,但为了产生活性GRF,需要裂解融合多肽(Villa et al., Eur. J. Biochem. 171-137, 1988;欧洲专利申请0199018)。本发明提供了能够在大肠杆菌中大量表达的多肽,但又不需要裂解就能获得具有活性的多肽。本发明提供了在氨基末端增加1个、2个或3个氨基酸,就能得到具有GRF活性的多肽化合物。本发明进一步提供了GRF的脱氨基酪氨酸衍生物。所述多肽化合物可以采用任何合成方法都能产生,包括固相肽合成、溶液肽合成、酶合成、半合成方法,以及重组DNA方法。

本发明提供的多肽化合物具有能在大肠杆菌中大量表达的生长激素释放因子(GRF)的活性。该多肽化合物还将采用其他肽合成的方法产生,包括固相合成方法。本发明还提供编码这些多肽的DNA化合物。本发明提供了由下式表示的能在大肠杆菌中大量表达的多肽化合物及其药物上可接受的无毒酸加成盐或羧酸加成盐:

A-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-R-Tyr-Arg-B-Val-Leu-C-
5 10 15

Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-D-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-E-Asn-Arg-X;
20 25

式中 A 是 Met, Met-Tyr, Met-Ala-Tyr, Met-Arg-Tyr,
Met-Asp-Tyr, Met-Gly-Tyr, Met-Leu-Tyr, Met-Pro-Tyr,
Met-Ser-Tyr, Met-Ala-Ala-Tyr, Met-Arg-Pro-Tyr,
Met-Asp-Pro-Tyr, Met-Gly-Pro-Tyr, Met-Phe-Pro-Tyr,
Met-Pro-Pro-Tyr 或 Met-Ser-Pro-Tyr; R 是 Asn 或 Ser; B
是 Arg 或 Lys; C 是 Gly, Ala, Leu, Val, Ile, 或 Thr; D
是 Arg 或 Lys; E 是 Met, Val, Leu, 或 Ser;

X 是长度足以在大肠杆菌中大量表达的氨基酸残基的链; 具有游离氨基的 1 个或 1 个以上的氨基酸或缺失这些氨基酸都是经化学修饰得到的。

从本发明目的而言, “化学修饰” 定义为具有烷基或羟烷基的氨基酸的游离氨基的衍生。1 个或 1 个以上游离氨基或缺失这些游离氨基可以通过化学方法修饰。修饰的程度可通过反应时间或试剂用量控制。具有游离氨基的所有氨基酸都由化学修饰为佳, 在能够进行化学修饰的氨基末端仅含 1 个游离氨基的化合物则更佳。这样的一种化合物除了在 N 端外没有赖氨酸或蛋氨酸。含有赖氨酸和/或蛋氨酸的化合物, 通过用精氨酸取代赖氨酸和用亮氨酸取代蛋氨酸, 可转化为仅在 N 端具有游离氨基的化合物。

A 的较佳选择是 Met-Pro-Tyr 和 Met-Ala-Tyr; 最佳选择是 Met-Ala-Tyr。C 和 E 的较佳氨基酸分别是 Thr 和 Leu。但 X 可以是长度足以使化合物在大肠杆菌中大量表达的任何氨基酸链, 较佳的链长约为 31-100 个氨基酸, 更佳的链长约为 40-80 个氨基酸, 最佳的链长约为 45-55 个氨基酸。X 的最佳氨基酸选择为: Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-Gly-Ala-Lys-Val-Arg-Leu-Gly-Arg-Gln-Val-Asp-Ser-Leu-Trp-Ala-Glu-Gln-Lys-Gln-Leu-Glu-Leu-Glu-Ser-Ile-Leu-Val-Ala-Leu-Leu-Gln-Lys-His-Ser-Arg-Asn-Ser-Gln-Gly.

该氨基酸顺序表示具有全都由亮氨酸取代蛋白酸人GRF 前体的 C端48个氨基酸。以上顺序中的赖氨酸被精氨酸取代时, 得到了 X的另一个较佳选择

Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-Gly-Ala-Arg-Val-Arg-Leu-Gly-Arg-Gln-Val-Asp-Ser-Leu-Trp-Ala-Glu-Gln-Arg-Gln-Leu-Glu-Leu-Glu-Ser-Ile-Leu-Val-Ala-Leu-Leu-Gln-Arg-His-Ser-Arg-Asn-Ser-Gln-Gly.

该顺序之所以较佳是由于如果 B和 D都为精氨酸, 则生成的化合物仅具有 1个游离氨基, 因而能产生经化学修饰的均一的化合物。

X 的另一个较佳氨基酸顺序包括口蹄病病毒表面蛋白的肽和组成GRF 的氨基酸顺序, 从而形成了GRF 二聚体。X 的适宜顺序包括:

Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-Gly-Ala-Lys-Val-Arg-Leu-Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Thr-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Gln-Asp-Ile-Leu-Asn-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-Gly-Ala-Lys-Val-Arg-Leu and Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Glu-Glu-Gln-Gly-Ala-Lys-Val-Arg-Leu-Gly-Arg-Gln-Val-Asp-Ser-Met-Trp-Ala-Glu-Gln-Lys-Gln-Met-Glu-Leu-Glu-Ser-Ile-Leu-Val-Ala-Leu-Leu-Gln-Lys-His-Ser-Arg-Asn-Ser-Gln-Gly.

本发明的另一类多肽化合物是由下式表示的多肽化合物及其在药物上可接受的无毒酸加成盐或羧酸盐:

A-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-R-Tyr-Arg-B-Val-
5 10

Leu-C-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-D-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-E-
15 20 25

Asn-Arg-X;

式中 A 是 Met, desNH₂-Tyr, Ala-Tyr, Gln-Tyr, Gly-Tyr, His-Tyr, Met-Tyr, Phe-Tyr, Pro-Tyr, Ser-Tyr, Ala-Ala-Tyr, Arg-Ala-Tyr, Asp-Ala-Tyr, Phe-Ala-Tyr, Pro-Ala-Tyr, Pro-Pro-Tyr, Met-Ala-Tyr, Met-Arg-Tyr, Met-Asp-Tyr, Met-Leu-Tyr, Met-Pro-Tyr, Met-Ser-Tyr, Met-Ala-Ala-Tyr, Met-Arg-Pro-Tyr, Met-Asp-Pro-Tyr, Met-Gly-Pro-Tyr, Met-Phe-Pro-Tyr, 或 Met-Ser-Pro-Tyr; R 是 Asn 或 Ser; B 是 Arg 或 Lys; C 是 Gly, Ala, Leu, Val, Ile, 或 Thr; D 是 Arg 或 Lys; E 是 Met, Val, Leu 或 Ser;

Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-B-Val-
5 10

Arg-X;

X 是NH₂ 或具有1-30个氨基酸长度的氨基酸链; 具有游离氨基的 1个或 1个以上氨基酸或缺失这些氨基酸是通过化学修饰得到的。

本发明的多肽化合物与天然的bGRF有若干不同之处。天然的bGRF的氨基酸顺序如下:

Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-
5 10
Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-
15 20 25
Met-Asn-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-Gly-
30 35
Ala-Lys-Val-Arg-Leu.
40

与此相反, 本发明提供的GRF 类似物, 在氨基端和/ 或羧基端不同于天然的bGRF。此外, 本发明的类似物在15位上的甘氨酸被苏氨酸取代。

在 1位上天然GRF 的氨基末端是酪氨酸, 而本发明多肽化合物除了 A 为Met 外, 还在N 端被延长。这种延长称之为可变 A。当在大肠杆菌中产生时, A 以蛋氨酸开始、继之丙氨酸, 甘氨酸, 脯氨酸或丝氨酸的本发明化合物经过天然处理后, 释出起始子蛋氨酸。这种方法产生了 A 以丙氨酸, 甘氨酸, 脯氨酸或丝氨酸开始的本发明化合物。A为 Met 的化合物在除去蛋氨酸后, 产生的化合物的活性很低, 但生成的化合物可用作 1位上取代的化合物的底物, 例如 1位上为酪氨酸的化合物可被“脱NH₂-酪氨酸”取代。非蛋氨酸开始的本发明化合物可采用包括固相肽合成方法的各种合成方法产生。另外, A为Gln-Tyr, His-Tyr, Phe-Tyr, Arg-Ala-Tyr, Asp-Ala-Tyr, Phe-Ala-Tyr和 E为缬氨酸、亮氨酸或丝氨酸的本发明化合物可先用重组技术继之用溴化氰裂解起始子蛋氨

酸的方法产生。溴化氰裂解只能用于 X 所表示的氨基酸不包括蛋氨酸。本领域专业人员所掌握的凡能产生本发明化合物的其他方法均可使用。

本发明的有些多肽在羧基端上具有由 X限定的氨基酸。已知天然 GRF 的活性部位是在N-端的29个氨基酸(Rivier et al., Nature 300: 276, 1982)。X为30个氨基酸以上的氨基酸链的本发明多肽化合物是由氨基酸能延长到足以在大肠杆菌中大量表达但仍保持GRF 活性的化合物中产生的。

本发明认为需要总长度最小约为60个氨基酸才能在大肠杆菌中获得高产率的GRF。由X(当X为30个以上氨基酸的氨基酸链时)限定的C端的延长是以任何氨基酸链都能延长链的长度并保持其GRF活性为基础。但是具有人GRF前体的C端33个氨基酸的牛GRF化合物(本发明的较佳多肽化合物)在牛和羊中活性最高,该化合物在猪、猫和鸡中也有一定活性。

本发明包括化学修饰形式的本发明多肽化合物。烷基化肽的方法已为本领域专业人员所公知(Acharya and Manjula, Biochem. 26:3524, 1987; Brown and Greenberg, Anal. Letters 17:1429, 1984)。烷基化的衍生物是在其游离氨基上被由 0、1 个或 1 个以上羟基取代的 C_1 - C_6 直链或支链烷基所取代。较佳的基团是 C_1 - C_3 直链羟烷基基, 更佳的取代基团是甲基、2-羟乙基和 2,3-二羟丙基, 最佳的基团是 2,3-二羟丙基。

较佳的多肽化合物是:

Ala-Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-
0 5 10
Val-Leu-Thr-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-
15 20 25
Ile-Leu-Asn-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-
30 35

Gly-Ala-Lys-Val-Arg-Leu-Gly-Arg-Gln-Val-Asp-Ser-Leu-
40 45 50
Trp-Ala-Glu-Gln-Lys-Gln-Leu-Glu-Leu-Glu-Ser-Ile-Leu-
55 60
Val-Ala-Leu-Leu-Gln-Lys-His-Ser-Arg-Asn-Ser-Gln-Gly.
65 70 75

更佳的上述化合物的衍生物，其中 0 位上的丙氨酸和12、21、41、56和70 位上的赖氨酸的游离氨基被2,3-二羟丙基取代。与天然分子相比，该化合物在体内具有更高的生长激素释放因子的活性。另一个较佳化合物是由上述化合物经精氨酸取代所有 5 个赖氨酸衍生得到的下述化合物：

Ala-Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Arg-
0 5 10
Val-Leu-Thr-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Arg-Leu-Leu-Gln-Asp-
15 20 25
Ile-Leu-Asn-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-
30 35
Gly-Ala-Arg-Val-Arg-Leu-Gly-Arg-Gln-Val-Asp-Ser-Leu-
40 45 50
Trp-Ala-Glu-Gln-Arg-Gln-Leu-Glu-Leu-Glu-Ser-Ile-Leu-
55 60
Val-Ala-Leu-Leu-Gln-Arg-His-Ser-Arg-Asn-Ser-Gln-Gly.
65 70 75

生成的化合物只在其能进行化学修饰的氨基末端具有游离氨基。

本发明更佳的多肽化合物是：

(脱 NH₂-Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Asn-Tyr-Arg-Arg-Val-
5 10
Leu-Thr-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Arg-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Leu-
15 20 25

Ser-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-Gly-Ala-Arg-
30 35 40
Val-Arg-Leu-Gly-Arg-Gln-Val-Asp-Ser-Leu-Trp-Ala-Asp-Gln-
45 50 55
Arg-Gln-Leu-Ala-Leu-Glu-Ser-Ile-Leu-Ala-Thr-Leu-Leu-Gln-
60 65
Glu-His-Arg-Asn-Ser-Gln-Gly.
70 75

本发明另一个多肽化合物是由下式表示的化合物:

Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-B-Val-Leu-
5 10
C-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-D-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-E-Asn-Arg-X;
15 20 25

式中 B 是 Arg 或 Lys; C 是 Thr; D 是 Arg 或 Lys; E 是 Met, Val, Leu 或 Ser; X 是 NH₂ 或任何长度的氨基酸残基链。较佳的选择是 X 为 NH₂; 更佳的选择是下式化合物: Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-

Gly-Ala-Lys-Val-Arg-Leu-Gly-Arg-Gln-Val-Asp-Ser-Leu-
Trp-Ala-Glu-Gln-Lys-Gln-Leu-Glu-Leu-Glu-Ser-Ile-Leu-
Val-Ala-Leu-Leu-Gln-Lys-His-Ser-Arg-Asn-Ser-Gln-Gly,
and Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-Gly-Ala-Arg-
Val-Arg-Leu-Gly-Arg-Gln-Val-Asp-Ser-Leu-Trp-Ala-Glu-
Gln-Arg-Gln-Leu-Glu-Leu-Glu-Ser-Ile-Leu-Val-Ala-Leu-
Leu-Gln-Lys-His-Ser-Arg-Asn-Ser-Gln-Gly.

本申请还提供了编码本发明多肽的经过分离的 DNA 化合物。本领域专业人员知道什么样的密码子可用于产生各氨基酸。本发明较佳的 DNA 化合物编码更佳的多肽化合物, 该多肽化合物中的 A 是 Ala - Thr, B

是Lys, C是Thr, D是Lys, E是Leu, X是 Gln-Gln-Gly-
 Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-Gly-Ala-Lys-Val-Arg-Leu-Gly-
 Arg-Gln-Val-Asp-Ser-Leu-Trp-Ala-Glu-Gln-Lys-Gln-Leu-
 Glu-Leu-Glu-Ser-Ile-Leu-Val-Ala-Leu-Leu-Gln-Lys-His-
 Ser-Arg-Asn-Ser-Gln-Gly,

和

ATG GCT TAT GCT GAT 15
 GCT ATA TTT ACT AAT TCT TAT CGT AAA GTA CTT ACT CAG CTG TCT 60
 GCA CGT AAA CTG CTA CAA GAT ATC CTG AAC CGT CAA CAG GGT GAA 108
 CGT AAT CAG GAA CAA GGT GCC AAG GTA CGC CTG GGT CGT CAG GTA 153
 GAT TCT CTG TGG GCA GAA CAA AAG CAA CTT GAA CTG GAA CTG ATC 198
 CTG GTT GCT CTG CTG CAA AAA CAT TCT CGT AAC TCC CAG GGT TAA 243
 TAG 246

式中A 是脱氧腺苷残基, G是脱氧鸟苷残基, C是脱氧胞苷残基, T是胸苷残基。

本发明的其他DNA 化合物包括但不限于下式化合物:

ATG GCT TAT GCT GAT 15
 GCT ATA TTT ACT AAT TCT TAT CGT AAA GTA CTT ACT CAG CTG TCT 60
 GCA CGT AAA CTG CTA CAA GAT ATC ATG AAC CGT CAA CAG GGT GAA 108
 CGT AAT CAG GAA CAA GGT GCC AAG GTA CGC CTG GGT CGT CAG GTA 153
 GAT TCT ATG TGG GCA GAA CAA AAG CAA ATG GAA CTG GAA CTG ATC 198
 CTG GTT GCT CTG CTG CAA AAA CAT TCT CGT AAC TCC CAG GGT TAA 243
 TAG 246;

ATG CCG TAT GCT GAT 15
GCT ATA TTT ACT AAT TCT TAT CGT AAA GTA CTT ACT CAG CTG TCT 60
GCA CGT AAA CTG CTA CAA GAT ATC CTG AAC CGT CAA CAG GGT GAA 108
CGT AAT CAG GAA CAA GGT GCC AAG GTA CGC CTG GGT CGT CAG GTA 153
GAT TCT CTG TGG GCA GAA CAA AAG CAA CTT GAA CTG GAA CTG GAA 198
TCG ATC GTT GCT CTG CTG CAA AAA CAT TCT CGT AAC TCC CAG GGT 243
TAA TAG 249;

和

ATG CCG TAT GCT GAT 15
GCT ATA TTT ACT AAT TCT TAT CGT AAA GTA CTT ACT CAG CTG TCT 60
GCA CGT AAA CTG CTA CAA GAT ATC ATG AAC CGT CAA CAG GGT GAA 105
CGT AAT CAG GAA CAA GGT GCC AAG GTA CGC CTG GGT CGT CAG GTA 150
GAT TCT ATG TGG GCA GAA CAA AAG CAA ATG GAA CTG GAA TCG ATC 195
CTG GTT GCT CTG CTG CAA AAA CAT TCT CGT AAC TCC CAG GGT TAA 240
TAG. 243

以下部分将详细说明本发明。如本文所公开的和要求保护的内容，为了清楚阐明和帮理解本发明，下列术语和缩写词的定义如下。

bGRF—具有牛生长激素释放因子活性的多肽。

bGRF(1-78)OH—含有人GRF 前体的羧基末端33个氨基酸的多肽。

bGRF二聚体—具有首尾连接的 2个bGRF化合物的多肽化合物。

bp—双股DNA 的碱基对。

c1857 —编码对温度敏感的 λ pL启动子的阻遏物的基因。

克隆—将DNA 片段掺入到重组DNA 克隆载体的方法。

编码顺序—基因中的DNA 顺序，该顺序编码由该基因表达的蛋白质

的氨基酸残基的顺序，或在rRNA或tRNA基因条件下编码由基因表达的rRNA或tRNA的RNA顺序。

装配质粒—重组DNA克隆载体，能按如质粒的相同方法在宿主细胞中复制而又能利用噬菌体包装机制。

DHP —2,3-二羟丙基。

基因—DNA片段，包括定位的启动子、转译活性顺序、编码顺序和3'调节顺序，以控制蛋白质（和因此所需的mRNA）、tRNA或rRNA基因产物的表达。

GRF —具有生长激素释放因子活性的多肽。

GRG(1-29)NH —全潜能所需的GRF最小部分。

大肠杆菌中的大量表达—能由考马斯兰染色检测到基因产物量的克隆基因编码的GRF类似物的产物。

分离的DNA化合物—能够构建或合成的任何DNA顺序，其在位置上区别于产生该顺序的有机体的基因组DNA。

pL— λ 噬菌体的左侧启动子。

启动子—指导或启动DNA转录的DNA顺序。

重组DNA克隆载体—任何自主复制或整合物，包括但不限于含有能够或已经附加1个或多个DNA分子的DNA分子的质粒。

重组DNA表达载体—任何自主复制或整合物，包括但不限于含有定位启动子和其他调节顺序以控制编码多肽或RNA的DNA片段表达的质粒。

重组DNA顺序—除了可衍生DNA顺序的宿主染色体外的任何DNA顺序，包括经过分离、合成或部分合成得到的DNA顺序。

重组DNA载体—任何重组DNA克隆或表达载体。

限制片段—由1个或多个酶的作用产生的任何线性DNA分子。

TcR —给予四环素抗性的基因，也可用于表示四环素抗性的表现

型。

转录终止区—通过RNA 聚合酶提供DNA 终止信号的DNA 顺序。

转化株—经过转化的受体宿主细胞。

转化—将DNA 引入能改变基因型的受体宿主细胞，从而改变受体细胞。

转译活性顺序—当转录到mRNA时启动mRNA转译为蛋白质的调节DNA 顺序。

本文全文均采用标准三字母表示的氨基酸简写符号。

附图所示的限制性位点和功能图大致表示本文所讨论的重组DNA 载体。限制性位点的信息并非包揽无遗，因此一定类型的载体的限制位点实际上可多于图中所示。

图1：质粒pHS190的限制性位点和功能图。

图2：质粒pHS451的限制性位点和功能图。

本发明包括具有生长激素释放因子活性的能在大肠杆菌中大量表达但又不需离体裂解为活性的多肽。该化合物还可由任何合成方法产生，包括酶、溶液、半合成和固相肽合成等方法。本发明的有些多肽化合物（其中包括以精氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、组氨酸或苯丙氨酸开始的多肽化合物）如果是由重组方法产生的，则需要离体除去开始的蛋氨酸。

GRF 用于刺激生长激素的释放。本发明化合物适宜用于动物，尤其是牛、猪、羊、家禽和鱼。本发明还提供编码GRF 多肽的DNA 化合物。这些化合物也包括在本发明范围之内。

根据对 A不同选择生成的氨基酸，多肽可分成若干类。A为蛋氨酸和 X为31或31个左右长度的氨基酸链的化合物，在大肠杆菌中能大量产生。如果第2个氨基酸是丙氨酸、甘氨酸、脯氨酸或丝氨酸，则开始的蛋氨酸可通过细菌裂解，生成仍保持GRF 活性的分子。A以Met-Pro 开始的化合物仍保留其这个特征。美国专利4782139（1988 年11月1日公

开) 介绍了具有式H-X-Pro-肽的化合物, 其中 X表示天然氨基酸残基, 可用作具有生物活性的肽的中间体。

如果起始子蛋氨酸被去除, 则 A非蛋氨酸开始的化合物可通过合成方法产生, 包括固相肽合成方法或重组技术。如果第 2个氨基酸是丙氨酸、甘氨酸、脯氨酸或丝氨酸, 则蛋氨酸可用大肠杆菌在体内予以去除。当27位上的蛋氨酸由亮氨酸, 丝氨酸或缬氨酸取代时, 起始子蛋氨酸可用溴化氰在体外予以去除。

虽然 A为 Met的化合物的活性极低, 但是 N端延长的化合物仍具有GRF 活性。从已有技术角度来看, 在 0位上延长氨基酸会破坏GRF 活性, 但 N端延长的化合物的活性却令人惊奇(Ling et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 122:304, 1984)。该类化合物经烷基或羟烷基化处理, 可进一步提高GRF 活性。

另一类多肽化合物并不具有GRF 活性, 但可用于制备其类似物。当 A为 Met时, 生成的化合物能在大肠杆菌中大量表达。除去蛋氨酸后产生的脱酪氨酸化合物(2位的丙氨酸是氨基端的化合物) 能用于制备 1位上含有除酪氨酸外的其他氨基酸化合物的底物。1位上能够取代酪氨酸的部分的例子是脱NH₂-酪氨酸。

所有肽化合物都能采用固相肽合成方法或重组方法产生。两种方法在美国专利4617149 (本文参考文献) 中已作了介绍。如果需要高产量, 以采用重组方法为佳。Brown 等介绍了构建任何所需DNA 顺序的一般方法(Brown et al., Methods in Enzymology, 68:109; 1979, 本文参考文献)。本发明的有些多肽化合物能在大肠杆菌中大量产生。当 X为长于30个左右的氨基酸链时, 本发明化合物可以获得大量表达。由 X限制的链的关键特征是其长度。链的长度必须使化合物避免由于大肠杆菌蛋白酶的影响而造成显著降解。这种降解是本领域公认的一个问题。链的足够长度估计为60个氨基酸左右(表达化合物的总长度)。

以往对大肠杆菌中GRF 表达所作的种种尝试都不能令人满意。 第一个问题就是直接表达产生的GRF 量很低 (美国专利4728609 , Bhatt 等) 。Bhatt 等得到的GRF 量约为25nm/l。 X为30个左右以上长度的氨基酸链的本发明化合物在体内除去起始的蛋氨酸以后, 得到的量可高达103 μ m/l , 比Bhatt 等得到的量高约4000倍左右。由其他研究工作者将GRF 与其他多肽融合后, 其表达产生了大量的化合物。由于与获得大量表达所需的另一个多肽顺序融合, 所以需要进行离体裂解才能产生活性分子(Villa et al., Eur. J. Biochem. 171:137, 1988; Geli et al., Gene, 80:129, 1989; 欧洲专利申请0199018)。

本发明提供了能够直接在大肠杆菌中大量表达的多肽化合物, 但是不需要离体裂解步骤就能产生活性分子。如同在大肠杆菌中制备所有蛋白质一样, A以丙氨酸、甘氨酸、脯氨酸或丝氨酸开始的本发明化合物的表达是与起始的蛋氨酸连接在一起的。蛋氨酸可通过细菌的内源蛋氨酸氨基肽酶除去, 从而产生活性化合物。

本发明较佳的多肽在 X位上具有由人GRF 前体分子衍生的氨基酸链 (Gubler et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA80:4311, 1983)。由于前体一般被理解为没有活性, 所以该分子具有活性出乎意料, 从而能通过裂解步骤使细胞能调节活性化合物的水平 (参阅Giraud et al., 124: 1711, 1989; Fisher and Scheller, J. Biol. Chem. 263:16515, 1988; Smith and Funder, Endocr. Rev. 9:159, 1988) 。有关GRF 前体的参考文献都认为该前体是没有活性的(Hammer et al., Nature 315:413, 1985; Mayo et al., Nature 306:86, 1983; Mayo et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 80:4311, 1983) 。

本发明更佳的多肽化合物包括由亮氨酸取代蛋氨酸的人GRF 前体的羧基末端。该化合物如下:

Ala-Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-
0 5 10
Leu-Thr-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Leu-
15 20 25
Asn-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-Gly-Ala-Lys-
30 35 40
Val-Arg-Leu-Gly-Arg-Gln-Val-Asp-Ser-Leu-Trp-Ala-Glu-Gln-
45 50 55
Lys-Gln-Leu-Glu-Leu-Glu-Ser-Ile-Leu-Val-Ala-Leu-Leu-Gln-
60 65
Lys-His-Ser-Arg-Asn-Ser-Gln-Gly.
70 75

该分子的烷基化, 使 0 位上的丙氨酸和12、21、41、56及70位上的赖氨酸的游离氨基由2,3-二羟丙基取代, 从而产生活性更高的优选化合物。

本发明的其他优选化合物如下:

Ala-Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Arg-Val-
0 5 10
Leu-Thr-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Arg-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Leu-
15 20 25
Asn-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-Gly-Ala-Arg-
30 35 40
Val-Arg-Leu-Gly-Arg-Gln-Val-Asp-Ser-Leu-Trp-Ala-Glu-Gln-
45 50 55
Arg-Gln-Leu-Glu-Leu-Glu-Ser-Ile-Leu-Val-Ala-Leu-Leu-Gln-
60 65
Arg-His-Ser-Arg-Asn-Ser-Gln-Gly;
70 75

Pro-Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-
0 5 10
Leu-Thr-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Leu-
15 20 25

Asn-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-Gly-Ala-Lys-
30 35 40

Val-Arg-Leu-Gly-Arg-Gln-Val-Asp-Ser-Leu-Trp-Ala-Glu-Gln-
45 50 55

Lys-Gln-Leu-Glu-Leu-Glu-Ser-Ile-Leu-Val-Ala-Leu-Leu-Gln-
60 65

Lys-His-Ser-Arg-Asn-Ser-Gln-Gly;
70 75

Pro-Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-
0 5 10

Leu-Thr-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Leu-
15 20 25

Asn-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-Gly-Ala-Lys-
30 35 40

Val-Arg-Leu-Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-
45 50 55

Lys-Val-Leu-Thr-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-
60 65

Ile-Leu-Asn-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-Gly-
70 75 80

Ala-Lys-Val-Arg-Leu;
85

Met-Ala-Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-
0 5 10

Val-Leu-Thr-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-
15 20 25

Leu-Asn-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-Gly-Ala-
30 35 40

Lys-Val-Arg-Leu-Gly-Arg-Gln-Val-Asp-Ser-Leu-Trp-Ala-Glu-
45 50

Gln-Lys-Gln-Leu-Glu-Leu-Glu-Ser-Ile-Leu-Val-Ala-Leu-Leu-
55 60 65

Gln-Lys-His-Ser-Arg-Asn-Ser-Gln-Gly;
70 75

Met-Ala-Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-
0 5 10

Val-Leu-Thr-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-
15 20 25

Met-Asn-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-Gly-Ala-
30 35 40

Lys-Val-Arg-Leu-Gly-Arg-Gln-Val-Asp-Ser-Met-Trp-Ala-Glu-
45 50

Gln-Lys-Gln-Met-Glu-Leu-Glu-Ser-Ile-Leu-Val-Ala-Leu-Leu-
55 60 65

Gln-Lys-His-Ser-Arg-Asn-Ser-Gln-Gly;
70 75

Pro-Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-
0 5 10

Val-Leu-Thr-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-
15 20 25

Ile-Met-Asn-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-
30 35

Gly-Ala-Lys-Val-Arg-Leu-Gly-Arg-Gln-Val-Asp-Ser-Met-
40 45 50

Trp-Ala-Glu-Gln-Lys-Gln-Met-Glu-Leu-Glu-Ser-Ile-Leu-
55 60

Val-Ala-Leu-Leu-Gln-Lys-His-Ser-Arg-Asn-Ser-Gln-Gly; and
65 70 75

desNH₂-Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Asn-Tyr-Arg-Arg-Val-
5 10

Leu-Thr-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Arg-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Leu-
15 20 25

Ser-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-Gly-Ala-Arg-
30 35 40

Val-Arg-Leu-Gly-Arg-Gln-Val-Asp-Ser-Leu-Trp-Ala-Asp-Gln-
45 50 55

Arg-Gln-Leu-Ala-Leu-Glu-Ser-Ile-Leu-Ala-Thr-Leu-Leu-Gln-
60 65

Glu-His-Arg-Asn-Ser-Gln-Gly.
70 75

本发明化合物中还包括其在药物上可接受的无毒酸加成盐及其在药物上可接受的无毒羧酸盐。

“羧酸盐”包括胺、铵、季铵、碱金属和碱土金属一类的盐，例如钙、镁、钠、钾和锂等。

A-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-R-Tyr-
5 10

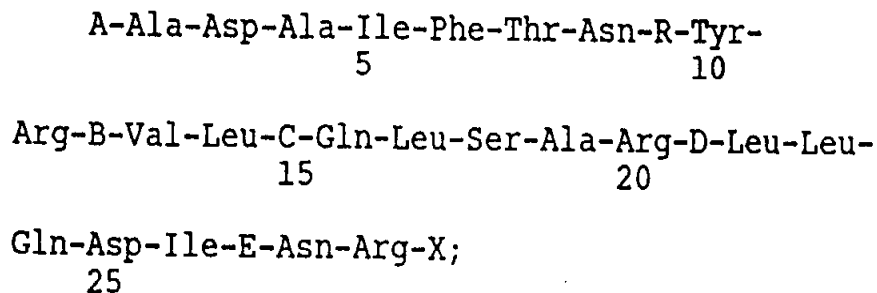
Arg-B-Val-Leu-C-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-D-Leu-Leu-
15 20

Gln-Asp-Ile-E-Asn-Arg-X;
25

- 18 -

或 1 个或多个氨基酸；具有游离氨基的 0、1 或 1 个以上的氨基酸可以进行化学修饰。

本发明还提供诱发生长激素释放的方法，包括施用有效量的由下式表示的多肽化合物：



式中 A 是 Ala-Tyr, 脱NH₂-Tyr, Gln-Tyr, Gly-Tyr, His-Tyr, Met-Tyr, Phe-Tyr, Pro-Tyr, Ser-Tyr, Ala-Ala-Tyr, Arg-Ala-Tyr, Asp-Ala-Tyr, Phe-Ala-Tyr, Pro-Ala-Tyr, Pro-Pro-Tyr, Met-Ala-Tyr, Met-Arg-Tyr, Met-Asp-Tyr, Met-Leu-Tyr, Met-Pro-Tyr, Met-Ser-Tyr, Met-Ala-Ala-Tyr, Met-Arg-Pro-Tyr, Met-Asp-Pro-Tyr, Met-Gly-Pro-Tyr, Met-Phe-Pro-Tyr, 和 Met-Ser-Pro-Tyr; R 是 Asn 或 Ser; B 是 Arg 或 Lys; C 是 Gly, Ala, Leu, Val, Ile, 或 Thr; D 是 Arg 或 Lys, E 是 Met, Val, Leu, 或 Ser; X 是 NH₂

或 1 个或多个氨基酸；具有游离氨基的 0、1 或 1 个以上的氨基酸可以进行化学修饰。

本发明的多肽化合物可在各种系统中进行测定。体内测定可在戊巴比妥钠麻醉的大鼠体内进行(Wehrenberg et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 109:382, 1982)。生长激素释放的测定可在体外用大鼠脑垂体细胞进行(Heiman et al., Endocrinol. 116:410, 1985)。如以下实施例所述，测定也可在阉小羊体内进行。

本发明的DNA 化合物编码本发明的多肽化合物。如何构建编码一定氨基酸顺序的DNA 顺序，系本领域的专业人员所熟知的。为了产生所需

的多肽，只需要将DNA 顺序插入到许多重组DNA 表达载体中的任何一个载体。编码顺序可通过操作与启动子和宿主细胞中起作用的核糖核蛋白体结合位点连接。较佳的载体由大肠杆菌质粒pHS190产生，含有TcR 基因、 λ CI857 遏阻物和 λ pL启动子。质粒pHS190于1988年9月9日保藏在美国北部实验室，保藏号为NRRL B-18410。

构建所需的DNA 顺序应使其在编码链的5'端具有 Xba I 位点和在编码链的3'端具有BamH I 位点。用EcoR I消化pHS 190，得到载体DNA 。插入突出端，并连接质粒。继之用BamH I 和 Xba I 消化，得到载体质粒。将所构建的GRF 编码顺序插入到载体中，被插入的DNA 顺序是本发明的较佳DNA 顺序，生成的质粒名为pHS451。所述较佳DNA 顺序为：

ATG GCT TAT GCT GAT 15.

GCT ATA TTT ACT AAT TCT TAT CGT AAA GTA CTT ACT CAG CTG TCT 60
GCA CGT AAA CTG CTA CAA GAT ATC CTG AAC CGT CAA CAG GGT GAA 108
CGT AAT CAG GAA CAA GGT GCC AAG GTA CGC CTG GGT CGT CAG GTA 153
GAT TCT CTG TGG GCA GAA CAA AAG CAA CTT GAA CTG GAA CTG ATC 198
CTG GTT GCT CTG CTG CAA AAA CAT TCT CGT AAC TCC CAG GGT TAA 243
TAG. 246

其他编码本发明多肽化合物的DNA 顺序为：

ATG GCT TAT GCT GAT 15

GCT ATA TTT ACT AAT TCT TAT CGT AAA GTA CTT ACT CAG CTG TCT 60
GCA CGT AAA CTG CTA CAA GAT ATC ATG AAC CGT CAA CAG GGT GAA 108
CGT AAT CAG GAA CAA GGT GCC AAG GTA CGC CTG GGT CGT CAG GTA 153
GAT TCT ATG TGG GCA GAA CAA AAG CAA ATG GAA CTG GAA CTG ATC 198
CTG GTT GCT CTG CTG CAA AAA CAT TCT CGT AAC TCC CAG GGT TAA 243
TAG 246

ATG CCG TAT GCT GAT 15

GCT ATA TTT ACT AAT TCT TAT CGT AAA GTA CTT ACT CAG CTG TCT 60
GCA CGT AAA CTG CTA CAA GAT ATC CTG AAC CGT CAA CAG GGT GAA 108
CGT AAT CAG GAA CAA GGT GCC AAG GTA CGC CTG GGT CGT CAG GTA 153
GAT TCT CTG TGG GCA GAA CAA AAG CAA CTT GAA CTG GAA CTG GAA 198
TCG ATC GTT GCT CTG CTG CAA AAA CAT TCT CGT AAC TCC CAG GGT 243
TAA TAG 249

和

ATG CCG TAT GCT GAT 15

GCT ATA TTT ACT AAT TCT TAT CGT AAA GTA CTT ACT CAG CTG TCT 60
GCA CGT AAA CTG CTA CAA GAT ATC ATG AAC CGT CAA CAG GGT GAA 105
CGT AAT CAG GAA CAA GGT GCC AAG GTA CGC CTG GGT CGT CAG GTA 150
GAT TCT ATG TGG GCA GAA CAA AAG CAA ATG GAA CTG GAA TCG ATC 195
CTG GTT GCT CTG CTG CAA AAA CAT TCT CGT AAC TCC CAG GGT TAA 240
TAG. 243

将连接的质粒转移到大肠杆菌株中，产生能够表达本发明多肽化合物的重组细胞。该细胞在32℃下培养到产生需要表达的多肽化合物。

CI857 遏阻物通过转移到42℃的培养温度使其失活，并且pL启动子失去遏阻。产生具有GRF活性的大量多肽高达总细胞蛋白的15%左右。采用本领域专业人员已知技术和以下实施例所述方法可以纯化所得活性多肽。

在非经肠道施用本发明多肽化合物时，适用于注射的药物形式包括无菌水溶液或分散液和能够配制成无菌注射溶液或分散液的无菌粉剂。载体可用溶剂或分散介质，例如包括水、乙醇、多羟基化合物（如丙三醇、丙二醇、聚乙二醇等）以及它们适合的混合物和植物油。采用包衣（如卵磷脂）、保持分散剂中符合要求的颗粒大小和使用表面活性剂等方法，能够保持合格的流动性。使用各种抗菌剂和抗真菌剂，例如对羟基苯甲酸、氯丁醇、苯酚和山梨酸等，能够确保不受微生物作用的影响。在许多情况下，还需要等渗剂，例如蔗糖、氯化钠等。注射药剂的延长吸收可以使用延迟吸收剂，例如一硬脂酸铝和明胶。

无菌注射液的制备：将本发明化合物加入到需要量的适当溶剂中，如果需要还可含有其他各种组份。如果需要，条分散得更均匀，可将化合物加入到缓释系统或靶缓释系统，例如聚合物基质、脂质体和微粒体。化合物可以采用机械传送装置、渗透泵或能提供连续或脉动释放的任何其他释放装置或系统。

给受体施用本发明化合物的时限是刺激生长激素释放所需要的时间。受体的体重和用药方式都会影响诱发具体应答所需剂量的大小。在羊中的较佳剂量约为0.1-3.0mg/天，最佳剂量约为1.0mg/天。牛用较佳剂量约为0.5-12mg/天，更佳剂量为3mg/天。

将本发明化合物配制成便于施用和剂量均匀的单位剂量形式则特别有利。本文所用的单位剂量系指适用于被治疗对象单一剂量的独立物理

单位。每个单位含有预定量的化合物，该预定量是根据与药物上可接受的载体结合后产生所需疗效计算得到的。根据(a) 具体组合物的特征和(b) 所要达到的具体疗效，直接规定具体单位剂量。

以下实施例是为了说明本发明，但并不是限制本发明的范围。

实施例 1: 质粒pHS 451 的构建

当宿主细胞在一定条件下进行培养时，质粒pHS 451 是产生大量本发明较佳多肽化合物的重组DNA 表达载体。

大肠杆菌K12 RV308/pHS190的冻干物可从美国NRRL(Peoria , IL 61604)得到，其保藏号为NRRL B-18410，保藏日期：1988年 9月 9日，并直接用作下述方法中的“培养物”。质粒pHS 190 的限制位点和功能图示于附图 1。将大肠杆菌K12 RV308/pHS 190 的培养物接种到10ml 含 $5\mu\text{g/ml}$ 四环素的TY培养液（每升10g 胰蛋白酶胨，5g NaCl 和5g 酵母膏）中，在30℃下通气培养过夜(15-18小时) 。生成的培养物用作质粒pHS 190 源。

将大肠杆菌K12 RV308/pHS 190 接种到 1升含 $5\mu\text{g/ml}$ 四环素的TY培养液中，在32℃下通气培养过夜(15-18小时) 。培养物于 4℃下在 Sorvall(DuPont Co., Instrument Products, Biomedical Division, Newtown, CT 06470) GSA离心机中(5200rpm) 离心10分钟，将细胞破碎。滗去形成的上清液，再将细胞碎片悬浮在28ml 蔗糖(25%) 和EDTA(50mM) 的溶液中。加入约1ml 的溶菌酶(20mg/ml) 的Tris-HCl(0.25M) 溶液(pH8.0) 和约1.5ml 的EDTA(0.5M, pH8.0) ，并与细胞悬浮液混合。生成的混合物在冰上培育15分钟。将3ml 溶菌溶液（由3ml 10% Triton[®] X-100(Rohm & Haas 混合制备)、75ml EDTA(0.25M, pH8.0) 和7ml 水加到溶菌酶处理过的细胞中，缓慢混合。生成的溶液在冰上再培育15分钟。

在 4℃下，用Sorvall SS34离心机(17000rpm) 离心约45分钟，从溶

液中除去细胞碎片。将大约28.6g CsCl和大约1ml 的溴乙锭(5mg/ml)溶液加到约30ml 上清液中。然后用水将体积调至40ml, 再将溶液滗到超速离心管中, 密封离心管, 在Ti70离心机(Beckman, 7360 N. Lincoln Avenue, Lincolnwood, IL 60646)中(49500rpm)将溶液离心约18小时。分离到用紫外光可目视到生成的质粒带, 用CsCl饱和异丙醇提取, 除去溴乙锭, 透析约20份体积的TE缓冲液(10mM Tris-HCl, pH7.5 和1mM EDTA) 3次变化。收集透析物, 然后加入2体积的乙醇和0.05体积乙酸钠溶液(3M)。将乙醇混合物冷却到-20℃。于-10℃下, 用SS34离心机(10000rpm)离心30分钟, 将质粒DNA 破碎。再将形成的碎片悬浮在大约1ml TE缓冲液中, 并用等体积苯酚: 氯仿混合物(1:1, V/V)提取。加0.1 体积的3M乙酸钠和2体积乙醇, 回收水相中的DNA, 继之在-20℃下培育约30分钟, 然后用SS34离心机(15000rpm)离心20分钟。生成的DNA 碎片先后用70% 乙醇和100%乙醇冲洗, 干燥。

将通过上述方法得到的约1.0g质粒pHS 190 DNA 悬浮在1.5ml 的0.1X TE 缓冲液中, 并贮藏于-20℃。约10μg 的质粒pHS 190 DNA 在含DNA 的EcoR I 缓冲液(100mM Tris-HCl, pH7.5, 5mM MgCl₂, 50mM NaCl) 的反应液中, 用限制性酶EcoR I (约10单位) 进行消化。反应物在37℃下培育2小时。

为了将5' 突出端转化为钝端, 将dNTP(dATP, dCTP, dGTP和TTP) 各0.5mM 仅与1-5 单位的克列诺夫片段(Boehringer Mannheim Biochemicals, 7941) Castleway Dr., P.O. Box 50816, Indianapolis, IN 46250) 一起加入。反应物在30℃下培育15分钟, 然后在75℃下处理10分钟使酶失活。反应混合物先用苯酚, 苯酚/氯仿, 氯仿提取, 然后用乙醇析出。

将质粒悬浮在含40mM Tris-HCl(pH7.5), 10mM MgCl₂, 10mM DTT, 0.5mM ATP 和1单位T4 DNA连接酶(Boehringer-Mannheim

Biochemicals, 7941 Castleway Drive, Indianapolis, IN 46250) 的 $50\mu\text{l}$ 溶液中。反应物在 14°C 培育过夜。

按下述Maniatis等人的方法(Maniatis et al., Molecular Cloning 250-251, 1982), 将连接的混合物转移到大肠杆菌K12 RV308 中(由 NRRL得到, 保藏号: NRRL B-15624, 保藏日期: 1983年9月28日)。将 100ml TY培养液置于 500ml 烧瓶中, 用 1ml 的RV308 过夜培养物接种。于 37°C 下, 细胞随着强烈摇动培养到密度约为 5×10^7 细胞/ ml 。将培养物置于冰上10分钟, 然后于 4°C 下离心($4000\times g$) 5分钟。将细胞悬浮在 50ml 冰冷却的 50mM CaCl_2 于 10mM Tris-HCl ($\text{pH}8.0$) 中。再将细胞在冰上培育15分钟后继续离心。然后再将细胞悬浮在 3.3ml 的氯化钙溶液中。将连接混合物加到 $200\mu\text{l}$ 细胞中, 在冰上培育30分钟。然后将细胞转移到 42°C 水浴中, 2分钟。将 1ml TY培养液加到试管中, 在 30°C 下将细胞培育1小时。将 $200\mu\text{l}$ 等份溶液置于含有 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 四环素的TY琼脂 (TY培养液+1.5%琼脂) 板上, 在 30°C 下培养过夜。

将质粒悬浮在 $10\mu\text{l}$ 水中, 用 Xba I 和 BamH I 消化质粒后得到载体。将大约 $1\mu\text{l}$ Xba I (约10单位) 加到 $10\mu\text{l}$ 质粒DNA (约 $10\mu\text{g}$) 和 $5\mu\text{l}$ 的 $10\times$ Xba I 缓冲液 (500mM Tris-HCl, $\text{pH}8.0$, 100mM MgCl_2 和 500mM NaCl) 中。在 37°C 下培育90分钟后, 加入 $0.5\mu\text{l}$ 的 5M NaCl 和 $1\mu\text{l}$ BamH I (约10单位), 在 37°C 再继续培育90分钟。该反应混合物经琼脂糖凝胶电泳, 先后通过电洗脱和乙醇析出, 分离得到约 5.75kb Xba I - BamH I 载体片段。

在应用生物系统380B型合成仪上, 采用本领域专业人员已知技术, 合成下列DNA 顺序。按Brown 等人所述方法(Brown et al., Methods in Enzymology 68:109, 1979) 将该顺序分成为各个45寡核苷酸。该DNA 顺序编码本发明较佳多肽, 其中 A是Met-Ala-Tyr, B是Lys, C是Thr, D是Lys, E是Leu, X是

Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-Gly-Ala-Lys-Val-
Arg-Leu-Gly-Arg-Gln-Val-Asp-Ser-Leu-Trp-Ala-Glu-Gln-
Lys-Gln-Leu-Glu-Leu-Glu-Ser-Ile-Leu-Val-Ala-Leu-Leu-
Gln-Lys-His-Ser-Arg-Asn-Ser-Gln-Gly.

```

CTAGAGGGTATTAATAATGTATATTGATTTTAATAAGGAGGAATAATCATATGGCTTATG
1868 --+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----
      TCCCATAATTATTACATATAACTAAAATTATTCCTCCTTATTAGTATACCGAATAC

CTGATGCTATATTTACTAATTCTTATCGTAAAGTACTTACTCAGCTGTCTGCACGTAAAC
1928 --+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----
      GACTACGATATAAATGATTAAGAATAGCATTTTCATGAATGAGTCGACAGACGTGCATTTG

TGCTACAAGATATCCTGAACCGTCAACAGGGTGAACGTAATCAGGAACAAGGTGCCAAGG
1988 --+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----
      ACGATGTTCTATAGGACTTGGCAGTTGTCCACTTGCATTAGTCCTTGTTCCACGGTTCC

TACGCCTGGGTCGTCAGGTAGATTCTCTGTGGGCAGAACAAAAGCAACTTGAAGTGAAT
2048 --+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----
      ATGCGGACCCAGCAGTCCATCTAAGAGACACCCGTCTTGTTTTCGTTGAAGTGAAGTGAAT

CGATCCTGGTTGCTCTGCTGCAAAAACATTCTCGTAACTCCCAGGGTTAATAG
2108 --+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----
      GCTAGGACCAACGAGACGACGTTTTTGTAAAGAGCATTGAGGGTCCCAATTATCCTAG

```

含有编码顺序的DNA 与以上构建的 Xba I - BamH I 载体片段混合和连接，然后将连接的混合物转移到如上所述的大肠杆菌K12 RV308 中。抗四环素转化株的质粒DNA 经限制性酶消化分析，证明该质粒为 pHS451。

实施例 2：大肠杆菌产生的GRF 类似物的纯化

A. GRF类似物在大肠杆菌中的表达

在32℃下，大肠杆菌K12 RV308/pHS451在含有 5μg/ml 四环素的TY 培养液中培养到细胞达到中等对数阶段。该混合物升温至42℃后，继续培育约 3 个多小时。将在质粒pHS451上定位控制GRF 类似物表达的λ pL 启动子的CI857 温敏遏阻物在42℃下失活，从而能够表达GRF 类似物。

B. 含GRF 类似物颗粒的分离

分离含GRF 类似物的颗粒。首先将全部细胞离心后，悬浮在10℃的水中，细胞浆在Gaulin均化器(8000 psig) 中均匀化。将均匀化的细胞浆在水中稀释，搅拌10分钟，然后用10% NaOH将pH调至8.4-8.6。离心该混合物，固体为含GRF 类似物的颗粒，在-70℃下冰冻至今后使用。

C. GRF类似物的最终纯化

实施例2B制备的颗粒在2-5℃熔化。加入10体积的0.05N 乙酸-7M尿素，均化5-8分钟，使该颗粒溶解。加入10% 盐酸，将pH调至2.5-2.6。在2-5℃下，搅拌该混合物12-15小时。用涂有Dicalite Speedex 助滤剂的Sparkler滤器(Grefco, Torrance, CA) 过滤，使溶液澄清。用乙酸-尿素溶液稀释后，使该溶液的导电率降至低于4000微欧姆。

用S. Sepharose[®] (Pharmacia, 800 Centennial Ave., Piscataway, NJ 08854) 树脂制备阳离子交换柱。交换柱含有每50g 材料1升树脂。以流速为0.11 /cm²/hr，将材料加到柱上，用2柱体积的0.1M氯化钠的乙酸-尿素溶液洗涤。按0.25M 至1.6M氯化钠的乙酸-尿素溶液的线性梯度洗脱GRF 类似物，以0.1 柱体积馏份收集3柱体积馏份。使用导电率0. D. 276、HPLC和聚丙烯酰胺凝胶电泳方法鉴定含GRF类似物馏份，并收集该馏份。

将等体积的乙酸-尿素溶液加到所收集的馏份中，然后将材料涂在含有S. Sepharose[®] 树脂的乙酸-尿素溶液的交换柱上，所涂的量应为每升树脂能容纳50g 蛋白质。流速为0.021 /cm²/hr。以0.25M 至1.2M氯化钠的乙酸-尿素溶液的线性梯度洗脱GRF 类似物馏份，按0.1 柱体积收集馏份。如上述方法分析馏份并收集含GRF 类似物馏份。

用0.02M 甘氨酸(pH2.5) 制备Sephadex[®] G-15(Pharmacia) 柱，其柱体积是以上所收集馏份的体积的5倍。分离得到含0. D. 276 峰的馏

份。

制备含SP20SS树脂(Sephacads, Mitsubishi Chemical, Tokyo)的10% 乙腈-0.02M甘氨酸(pH2.5) 溶液的柱。将含有所收集的GRF 类似物的溶液制备成10% 的乙腈溶液, 并以每小时1.5-2 柱体积的流速加到柱上, 用 2柱体积的乙腈- 甘氨酸缓冲液洗涤该柱。以 3柱体积的10% 乙腈- 0.02M 甘氨酸与 3柱体积的50% 乙腈- 0.02M 甘氨酸相混合形成的梯度溶液洗脱GRF 类似物。以0.1 柱体积收集馏份并测定GRF 类似物馏份。

用经0.25M 乙酸平衡的Sephadex[®] G15 柱对含GRF 类似物的材料进行色谱分析, 然后分离出0. D. 276 峰, 冻干至以后使用。

实施例 3: GRF类似物的二羟丙基化

基本上按Acharya 和Manjula 所述方法(Biochemistry 26:3524, 1987), 在氰基硼氢钠存在下, 用甘油醛处理, 使实施例 2 制备的一部份GRF 类似物二羟丙基化。

将5g 实施 2 制备的类似物在室温下搅拌溶解于60ml 25% 1- 丙醇的0.1%三氟乙酸(Pierce, Rockford, IL) 中, 用约1.7ml 5N NaOH 将pH调至8, 加入0.92g DL- 甘油醛(Sigma Chemical Co., P. O. Box 14508, St. Louis, MO 63178) 和0.85g 氰基硼氢钠(Aldrich, Milwaukee, WI)。该混合物在室温下搅拌 1小时。用水装填 9×65cm的Sephadex[®] G-10 (Pharmacia, 800 Centennial Avenue, Piscataway, NJ 08854) 柱。用10ml 的25% 丙醇洗涤柱中含 GRF化合物的材料, 再用约1500ml H₂O洗脱柱。按24ml 的份量收集各馏份, 同时在280nm 处监测紫外萤光现象。在收集50 份馏份后, 洗脱缓冲液由水改为10% 乙酸。收集并冻干峰值馏份。

实施例 4: 阉小羊体内GRF 类似物及其烷基化的测定

12头阉小羊, 体重约65kg, 每头羊都在右肩后插入皮下插管, 并在

左侧插入颈静脉插管用于放血。用Infu-CheckTM (IVAC Corporation, P.O. Box 85335, San Diego, CA 92121-1579) 泵, 以每小时2.0ml 流速通过皮下插管, 施用注入液, 注入时间120 小时。将肽溶解于5ml 的0.01M H₃PO₄, 并用含0.1%羊血清清蛋白和50μg/ml 多粘菌素 B硫酸盐的NaH₂PO₄ 缓冲液稀释到1805ml。注入液含有20.8μg/ml 肽。剂量为1.0mg 类似物/羊/天。共有 2个处理组, 其中一组用本发明最佳化合物处理, 该化合物中的 A是Ala, B是Lys, C是Thr, D是Lys, E是Leu, X是 Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-

Glu-Gln-Gly-Ala-Lys-Val-Arg-Leu-Gly-Arg-Gln-Val-Asp-Ser-Leu-Trp-Ala-Glu-Gln-Lys-Gln-Leu-Glu-Leu-Glu-Ser-Ile-Leu-Val-Ala-Leu-Leu-Gln-Lys-His-Ser-Arg-Asn-Ser-Gln-Gly.

该化合物在表 1中称为 Ala⁰; 另一处理组用同样化合物处理, 但游离氨基已被单烷基化为2,3-二羟丙基。该化合物在表 1中表示为DHP Ala⁰。

所有羊在开始处理前24小时, 通过颈静脉插管每天放 4次血, 在整个处理期都按此继续进行, 直至处理结束后24小时终止。每次用药前后各半小时采集血样, 测定各血浆样品的生长激素释放。

每头羊在每天0700和1500小时喂给400g 高能量食物, 结果示于以下各表, 由此说明本发明化合物具有生长激素释放活性。实施例 3制备的本发明较佳化合物的结果示于表 1, 本发明其他化合物的结果示于其余各表中。

表2-8 给出了本发明各种GRF 类似物在阉小羊体内生长激素释放的测定结果。类似物按美国专利4617149(本文参考文献) 所述固相合成方法制备。类似物是所示各不同氨基酸组份和延长的牛GRF。

实施例 5

按美国专利4617149 所述固相合成方法合成各种bGRF肽类似物。根据Heiman等人(Endocrinol. 116:410, 1985) 所述方法, 测定大鼠脑垂体细胞中的合化合物。如表中所示组份, 类似物以人生长激素释放因子的前29个氨基酸顺序为基础。

实施例 6: 在 1 位上具有脱NH₂-Tyr 的GRF 类似物的制备

GRF 类似物:

脱NH₂-Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Asn-Tyr-Arg-Arg-Val-
5 10
Leu-Thr-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Arg-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Leu-
15 20 25
Ser-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-Gly-Ala-Arg-
30 35 40
Val-Arg-Leu-Gly-Arg-Gln-Val-Asp-Ser-Leu-Trp-Ala-Asp-Gln-
45 50 55
Arg-Gln-Leu-Ala-Leu-Glu-Ser-Ile-Leu-Ala-Thr-Leu-Leu-Gln-
60 65
Glu-His-Arg-Asn-Ser-Gln-Gly.
70

该类似物按如下所述方法制备。在氨基末端的 2 位上为丙氨酸的中间体按实施例 1 和 2 所述的重组方法制备, 但编码该中间体的下列DNA 顺序已被取代:

```

CTAGAGGGTATTAATAATGTATATTGATTTTAATAAGGAGGAATAAT
-----+-----+-----+-----+-----+
TCCCATAATTATTACATATAACTAAAATTATTCCTCCTTATTA

CATATGGCTGATGCTATTTTACTAATAATTATCGACGCGTTCTGACTCAGCTGTCTGCT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTATACCGACTACGATAAAAAATGATTATTAATAGCTGCGCAAGACTGAGTCGACAGACGA

CGTCGTCTGCTGCAGGATATTCTGTCTCGTCAGCAGGGTGAACGTAACCAGGAACAAGGA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GCAGCAGACGACGTCCTATAAGACAGAGCAGTCGTCCCACTTGCAATTGGTCCTTGTTCT

GCTCGTGTTCGTCTTGCTCGTCAGGTTGATTCTCTGTGGGCTGATCAACGTCAGCTTGCT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CGAGCACAAGCAGAACCAGCAGTCCAATAAGAGACACCCGACTAGTTGCAGTCGAACGA

CTCGAGTCTATCCTGGCTACTCTGCTGCAGGAACATCGTAATTCTCAGGGTTAATAG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GAGCTCAGATAGGACCGATGAGACGACGTCCTTGTAGCATTAAAGAGTCCCAATTATCCTAG

```

在室温下，将18 mg (2 μ mol) 的中间体搅拌悬浮在2 ml 的0.2 M Tris (pH 7.8) / 20% CH₃CN 中，再另加 400 μ l CH₃CN，保持一定程度的混浊。加入约10 mg (27.3 μ mol) 的3-(4-羟苯基) - 丙酸琥珀酰亚胺酯 (Pierce Chem. Co., P.O. Box 117, Rockford, IL 61105)，反应在室温下搅拌进行。30分钟后，除去20 μ l，并用0.1%三氟乙酸(TFA) 稀释到 400 μ l，用Pharmacia Pep RPCHR5/5 (0.5 mm $\times$ 5 cm) 注射29 μ l (0.37 mg/ml) 后进行分析并与底物作对比。

1小时后，用3-4 滴冰醋酸酸化反应混合物后，将其涂在2.5 $\times$ 28 cm Sephadex G-10柱上，用10% 乙酸洗脱。收集 8 ml 馏份，同时在 280 nm 波长处进行监测。合并7-9 馏份，冷冻并冻干，得到12 mg。将产物溶解于1 ml 的10% TFA 中，取0.1 ml 样品冻干在10个小并中。再将样品溶解在 1 μ g / μ l 的0.1 N 乙酸中，按实施例 5 方法进行测定。化合物显示效能为0.49 nM。

表 1

连续皮下注入阉小羊体内的生长激素应答

相对时间 (小时)	N.	平均血浆 GH ng/ml $\pm$ SE	
		GRF(1-78)OH	
		DHP Ala ⁰	Ala ⁰
-23	12	8 $\pm$ 2.0	2 $\pm$ 0.6
-15	12	8 2.6	4 1.0
0	开始皮下注入	- 1.0 mg / 羊 / 天	
1		7 2.3	3 0.8
9	12	31 8.0	7 2.8
25	12	37 6.8	8 1.6
33	12	38 7.4	14 4.0
49	12	34 5.4	16 5.9
57	12	55 11.6	16 3.1
73	12	56 10.0	13 3.6
81	12	71 12.4	20 3.9
97	12	78 11.7	26 4.3
105	12	73 10.5	22 3.4
121	12	85 17.2	29 4.5
121.5	终止注入		
+0.5		94 11.0	25 3.5
+1.0	6	94 19.0	19 4.3
+1.5	6	96 26.4	20 3.7
+2.5	6	115 30.8	35 7.8
+7.5	12	68 13.1	10 2.2
+12.0	12	51 10.1	6 1.3
+24.0	12	32 8.1	5 1.0

表 2

GRF类似物的IV型快速浓注射剂量对阉小羊中血浆生长激素构型的作用

相对时间 (分钟)	血浆 GH, ng/ml, $\pm$ SE ¹					
	A		B		C	
-45	3.1 $\pm$ 0.7		3.4 $\pm$ 0.7		3.9 $\pm$ 1.2	
15	134.0	26.2	108.9	23.0	109.6	28.0
30	73.4	10.4	44.6	9.4	41.2	10.6
60	20.9	1.8	12.2	1.8	10.6	3.3
90	6.8	1.2	4.9	0.8	5.7	1.1
120	4.0	1.1	4.1	1.0	3.8	1.1
180	3.0	1.0	2.3	0.6	2.5	1.1

相对时间 (分钟)	血浆 GH, ng/ml, $\pm$ SE ¹			
	D		E	
-45	1.4 $\pm$ 0.3		3.0 $\pm$ 0.8	
15	162.3	34.6	122.5	16.0
30	69.4	18.2	42.6	4.9
60	14.3	3.7	9.5	1.2
90	7.7	2.0	4.0	1.2
120	3.7	0.6	3.0	1.0
180	1.8	0.3	2.0	0.8

¹ 6 羊/处理-拉丁方A = R¹², ²¹T¹⁵L²⁷GRF(1-29)NH₂B = A⁰ R¹², ²¹T¹⁵L²⁷GRF(1-29)NH₂C = P⁰R¹², ²¹T¹⁵L²⁷GRF(1-29)NH₂D = N-甲基 A⁰R¹², ²¹T¹⁵L²⁷GRF(1-29)NH₂E = DHP A⁰R¹², ²¹T¹⁵L²⁷GRF(1-29)NH₂

表 3

GRF类似物的IV型快速浓注剂量对阉小羊中血浆生长激素构型的作用

相对时间 (分钟)	血浆 GH ng/ml $\pm$ SE ¹					
	A		B		C	
-45	2.2 $\pm$ 0.5		2.9 $\pm$ 0.6		2.5 $\pm$ 0.7	
15	115.5	51.5	107.7	20.6	81.1	13.6
30	35.8	14.4	40.1	6.2	35.4	3.8
60	8.0	3.2	14.8	1.8	11.2	1.2
90	3.4	0.7	6.1	1.1	4.3	0.8
120	3.2	1.6	2.7	0.7	3.9	2.1
180						
240						

¹ 6 羊/处理-拉丁方

A = F⁻¹A⁰R¹², ²¹T¹⁵L²⁷GRF(1-29)NH₂
 B = P⁻¹A⁰R¹², ²¹T¹⁵L²⁷GRF(1-29)NH₂
 C = D⁻¹A⁰R¹², ²¹T¹⁵L²⁷GRF(1-29)NH₂

表 4

GRF 类似物的 IV 型快速浓注射剂对阉小羊中血浆生长激素构型的作用

相对时间 (分钟)	血浆 GH ng/ml $\pm$ SE ¹				
	A	B	C	D	E
-45	1.7 $\pm$ 0.2	1.8 $\pm$ 0.4	1.9 $\pm$ 0.4	1.6 $\pm$ 0.2	1.6 $\pm$ 0.3
15	87.6 17.3	76.9 16.6	78.1 21.3	98.4 16.9	65.7 11.9
30	32.7 5.3	32.8 7.0	33.8 8.9	45.7 8.9	32.3 6.4
60	8.1 0.7	11.2 2.2	17.5 2.6	11.7 2.9	9.1 2.9
90	5.0 1.2	4.6 1.3	6.7 1.2	6.2 2.0	5.1 1.3
120	2.3 0.4	2.0 0.6	5.2 2.4	2.5 0.7	1.9 0.4
180	1.4 0.5	1.0 0.3	2.7 1.5	1.2 0.2	1.0 0.2

¹ 6 羊 / 处理 - 拉丁方A = S⁰R¹², 21T15L²⁷GRF(1-29)NH₂B = D⁰R¹², 21T15L²⁷GRF(1-29)NH₂C = A¹⁵S²⁷GRF(1-29)NH₂D = M⁻¹G⁰A¹⁵S²⁷GRF(1-29)NH₂E = M⁻¹L⁰A¹⁵S²⁷GRF(1-29)NH₂

表 5

GRF类似物的IV型快速浓注射剂对阉小羊中血浆生长激素构型的作用

相对时间 (分钟)	血浆 GH ng/ml $\pm$ SE ¹			
	A	B	C	D
-45	7.5 $\pm$ 1.4	6.2 $\pm$ 1.2	5.2 $\pm$ 1.0	5.2 $\pm$ 0.8
15	107.8 16.9	165.5 27.8	143.3 36.4	128.6 20.5
30	47.3 6.0	87.3 23.1	83.0 23.0	72.1 13.4
60	16.3 2.4	26.0 6.9	36.5 10.8	30.8 5.6
90	8.3 0.6	8.9 1.4	17.6 6.1	14.4 2.5
120	6.1 1.1	5.6 1.2	9.6 2.4	7.1 1.4
180	5.0 1.4	4.3 1.2	4.4 1.1	5.2 1.5

¹ 6 羊/处理—拉丁方

A = M⁻¹D⁰A¹S²7GRF(1-29)NH₂

B = M⁻¹R⁰A¹S²7GRF(1-29)NH₂

C = P⁰A¹S²7GRF(1-29)NH₂

D = F⁰A¹S²7GRF(1-29)NH₂

表 6

GRF类似物的IV型快速浓注剂量对阉小羊中血浆生长激素构型的作用

相对时间 (分钟)	血浆 GH ng/ml $\pm$ SE ¹			
	A	B	C	D
-45	2.9 $\pm$ 0.4	3.2 $\pm$ 0.3	4.5 $\pm$ 2.6	4.0 $\pm$ 0.8
15	98.0 11.2	135.8 30.3	133.2 35.3	172.5 47.3
30	45.6 5.0	90.0 20.6	105.0 20.1	86.4 20.9
60	30.9 4.9	27.2 3.2	47.9 12.6	20.2 3.3
90	8.7 1.3	9.6 1.9	20.5 6.5	8.8 2.9
120	3.7 0.6	5.7 1.3	11.0 2.6	7.8 4.2
180	2.3 0.4	3.3 0.9	3.8 0.6	3.8 2.1

¹ 6 羊/处理-拉丁方A = A⁻¹UR¹²21T¹⁵L²⁷GRF(1-29)NH₂B = R⁻¹AR¹²21T¹⁵L²⁷GRF(1-29)NH₂C = M⁻¹PA¹⁵S²⁷GRF(1-29)NH₂D = M⁻¹SA¹⁵S²⁷GRF(1-29)NH₂

表 1

GRF 类似物的 IV 型快速浓注剂量对阉小羊中血浆生长激素构型的作用

相对时间 (分钟)	血浆 GH ng/ml $\pm$ SE ¹		
	A	B	C
-45	2.0 $\pm$ 0.8	2.1 $\pm$ 0.5	2.6 $\pm$ 1.0
15	35.2 10.5	29.9 8.5	38.7 17.4
30	15.7 5.2	8.6 2.4	15.3 7.7
60	6.6 2.1	6.8 4.0	5.0 1.5
90	3.4 1.2	3.4 2.2	5.5 2.5
120	3.3 1.3	2.9 1.4	3.8 1.7
180	1.9 0.7	2.4 1.0	7.3 4.3
240	14.4 6.9	15.3 6.6	2.1 1.4

¹ 5 羊 / 处理, 1 个血浆样品 / 时间 (-45 分钟的系 60 和 30 个血浆样品的平均值)

A = C⁰R¹², 21T¹⁵L²⁷GRF(1-29)NH₂

B = H⁰R¹², 21T¹⁵L²⁷GRF(1-29)NH₂

C = Q⁰R¹², 21T¹⁵L²⁷GRF(1-29)NH₂

表 8

重组bGRF二聚体和bGRF前体的IV型快速浓注剂量对阉小羊体内血浆GH浓度的作用

相对时间 (分钟)	血浆GH浓度 , ng/ml $\pm$ S.E.			
	Pro ⁰ bGRF 二聚体		Pro ⁰ bGRF(1-78)OH	
-0.75	4.9 $\pm$	0.7	4.6 $\pm$	0.8
0		IV型快速浓注 *		
0.08	24.8	6.0	85.1	15.8
0.25	59.7	15.4	104.8	19.9
0.50	39.7	10.0	56.8	11.6
1.00	34.1	12.0	32.4	11.7
1.50	21.2	7.4	16.6	5.0
2.00	14.4	4.0	7.5	1.9
3.00	4.0	1.4	4.5	1.4
4.00	5.0	1.4	9.9	2.1

※ 剂量 = P⁰bGRF Dimer = 58.0 μ g/羊
P⁰bGRF(1-78)OH = 58.0 μ g/羊

表 9

大鼠脑垂体细胞中GRF 类似物中介的GH分泌的效能

类似物	效能 ^b nM (平均;n)	相对效能 ^c (% · std ^d)
hGRF (1-44)OH	.136; 3	1.0
[R ¹² ,T ¹⁵ ,R ²¹ ,L ²⁷]hGRF(1-29)NH ₂	.136; 10	1.0
DHP[R ¹² ,T ¹⁵ ,R ²¹ ,L ²⁷]hGRF(1-29)NH ₂	.17; 1	.8
[P ⁰ ,R ¹² ,T ¹⁵ ,R ²¹ ,L ²⁷]hGRF(1-29)NH ₂	.665; 2	.20
DHP[P ⁰ ,R ¹² ,T ¹⁵ ,R ²¹ ,L ²⁷]hGRF(1-29)NH ₂	1.01; 1	.13
[A ⁰ ,R ¹² ,T ¹⁵ ,R ²¹ ,L ²⁷]hGRF(1-29)NH ₂	.534; 9	.255
DHP[A ⁰ ,R ¹² ,T ¹⁵ ,R ²¹ ,L ²⁷]hGRF(1-29)NH ₂	.406; 2	.335
[N-Me-A ⁰ ,R ¹² ,T ¹⁵ ,R ²¹ ,L ²⁷]hGRF(1-29)NH ₂	.78; 3	.17
[N-Ac-A ⁰ ,R ¹² ,T ¹⁵ ,R ²¹ ,L ²⁷]hGRF(1-29)NH ₂	1.40; 2	.10
[Q ⁰ ,R ¹² ,T ¹⁵ ,R ²¹ ,L ²⁷]hGRF(1-29)NH ₂	.712; 2	.191
[G ⁰ ,R ¹² ,T ¹⁵ ,R ²¹ ,L ²⁷]hGRF(1-29)NH ₂	.337; 2	.36
[H ⁰ ,R ¹² ,T ¹⁵ ,R ²¹ ,L ²⁷]hGRF(1-29)NH ₂	.528; 1	.26
[D ⁰ ,R ¹² ,T ¹⁵ ,R ²¹ ,L ²⁷]hGRF(1-29)NH ₂	.56; 2	.24
[S ⁰ ,R ¹² ,T ¹⁵ ,R ²¹ ,L ²⁷]hGRF(1-29)NH ₂	.51; 2	.27
[P ⁻¹ ,P ⁰ ,R ¹² ,T ¹⁵ ,R ²¹ ,L ²⁷]hGRF(1-29)NH ₂	1.45; 1	.09
DHP[P ⁻¹ ,P ⁰ ,R ¹² ,T ¹⁵ ,R ²¹ ,L ²⁷]hGRF(1-29)NH ₂	.959; 1	.14
[P ⁻¹ ,A ⁰ ,R ¹² ,T ¹⁵ ,R ²¹ ,L ²⁷]hGRF(1-29)NH ₂	1.01; 2	.13
[R ⁻¹ ,A ⁰ ,R ¹² ,T ¹⁵ ,R ²¹ ,L ²⁷]hGRF(1-29)NH ₂	.885; 1	.15
[A ⁻¹ ,A ⁰ ,R ¹² ,T ¹⁵ ,R ²¹ ,L ²⁷]hGRF(1-29)NH ₂	.526; 2	.26
[F ⁻¹ ,A ⁰ ,R ¹² ,T ¹⁵ ,R ²¹ ,L ²⁷]hGRF(1-29)NH ₂	.643; 1	.21
[D ⁻¹ ,A ⁰ ,R ¹² ,T ¹⁵ ,R ²¹ ,L ²⁷]hGRF(1-29)NH ₂	1.55; 1	.09

^a GH对 1pM-1μM 类似物浓度的应答由ALLFIT计算。

(De Lean, A., et al., Am. J. Physiol.

235:E97 (1978).

^b 效能是对各类似物的EC₅₀。EC₅₀是获得50% 最大应答的浓度。^c EC₅₀ [R¹²,T¹⁵,R²¹,L²⁷]hGRF(1-29)NH₂ / EC₅₀ 类似物。^d Std = [R¹²,T¹⁵,R²¹,L²⁷]hGRF(1-29)NH₂

图 1

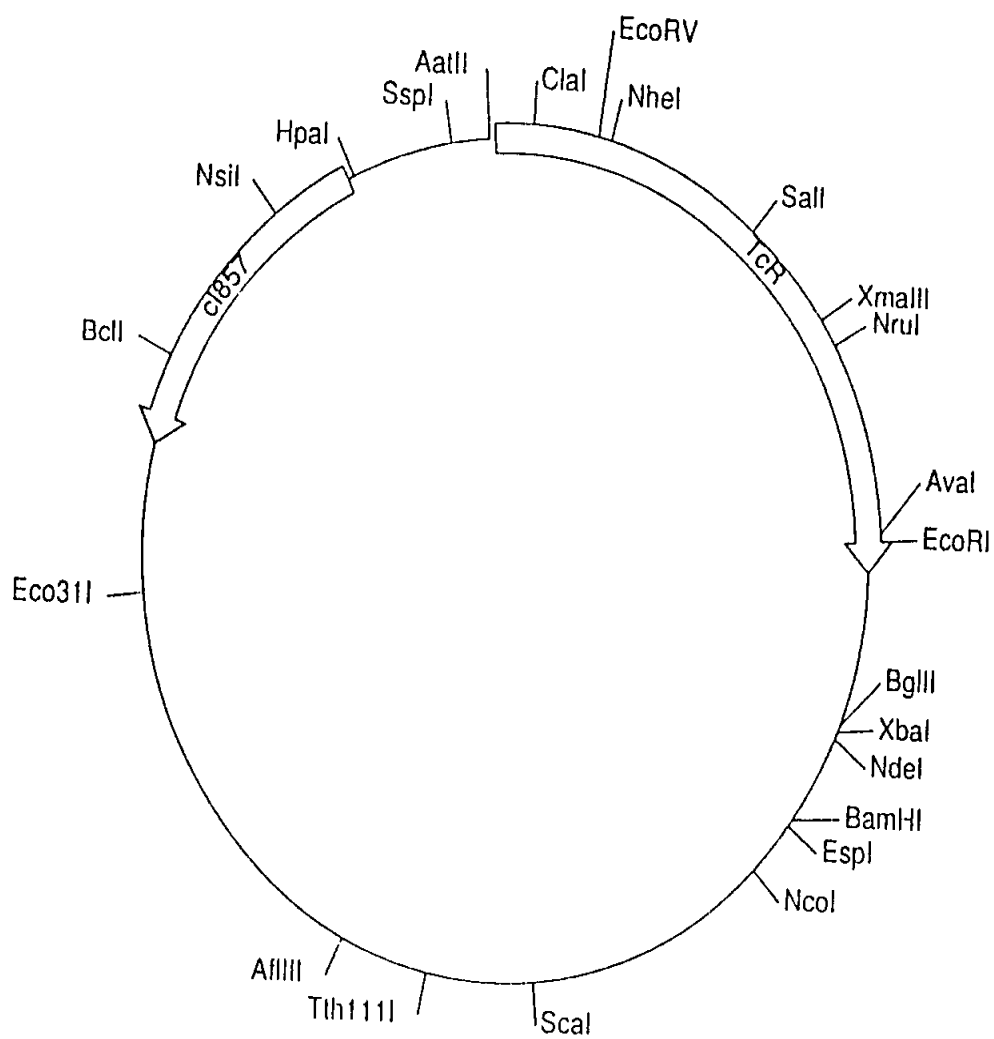


图 2

