

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

C07K 7/02

A61K 38/08

A61P 5/02

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 94194588.X

[45]授权公告日 2000年5月24日

[11]授权公告号 CN 1052730C

[22]申请日 1994.12.22 [24]颁证日 2000.2.19

[21]申请号 94194588.X

[30]优先权

[32]1993.12.23 [33]DK [31]1438/93

[32]1994.1.17 [33]DK [31]0075/94

[32]1994.6.30 [33]DK [31]0781/94

[32]1994.10.7 [33]DK [31]1165/94

[86]国际申请 PCT/DK94/00486 1994.12.22

[87]国际公布 WO95/17422 英 1995.6.29

[85]进入国家阶段日期 1996.6.21

[73]专利权人 诺沃挪第克公司

地址 丹麦 巴格斯瓦尔德

[72]发明人 N·L·约翰森 J·劳 K·马德森

B·F·朗特 H·索格森 B·S·翰森

[56]参考文献

CN1061606A 1992.6.3

EP257742 1988.3.2

审查员 周 莉

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所

代理人 张 闾

权利要求书 5 页 说明书 27 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 具有生长激素释放特性的化合物

[57]摘要

通式 A-B-C-D-E-(F)_p 的合成肽类,其中 p 为 0 或 1,因为用 氨基亚甲基(-CH₂NH-)取代了酰胺键(-CONH-),或是引入了 N-芳烷基甘氨酸,它具有改善了的对蛋白酶降解作用的抵抗力,以及用于激发垂体释放生长激素的药用组合物。

ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

1.一种通式 I 所示的化合物



其中

p 为 0 或 1;

A 是咪唑基 - C₁₋₆ 链烷酸、咪唑基 - C₁₋₆ 链烯酸、氨基 - C₁₋₆ 链烷酸或氨基 - C₁₋₆ 链烯酸或从下列氨基酸中选出的的一种 L - 或 D - α - 氨基酸: H - His、H - Ala、H - D - Ala、H - β - 丙氨酸、H - 氨基异丁酸、肌氨酸和 Gly;

B 是 D - Trp、D-2Nal 或 D - Phe;

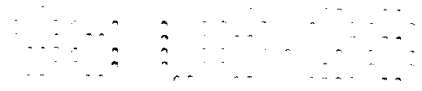
C 是 Ala、Ser 或 Gly;

D 是 Trp、Phe、 β - (2 - 噻吩基) - 丙氨酸或 N - 芳烷基甘氨酸;

当 p 为 1 时, E 是 D - Phe, 当 p 为 0 时, E 是 - NH - CH (CH₂ - R³) - CO - R⁴ 或 - NH - CH (CH₂ - R³) - CH₂ - R⁴, 其中

R³ 为苯基,

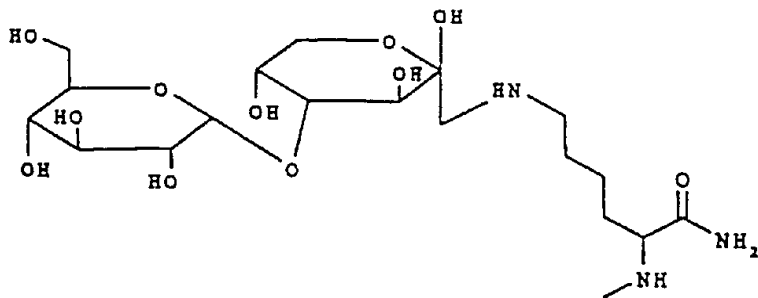
而 R⁴ 为哌嗪基、吗啉代、哌啶子基、- OH 或 - N (R⁵) R⁶, 其中 R⁵ 和 R⁶ 各自独立地为氢 或低级烷基;



当 p 为 1 时, F 是 $-NH-CH(R^{10})-(CH_2)_v-R^7$
 -, 其中

v 为 0 或 1 - 8 之间的一个整数, 而

R^7 为咪唑基、哌嗪基、吗啉代、哌啶子基或 $-N(R^8)-R^9$, 其中, R^8 和 R^9 各自独立地为氢 或低级烷基, 或氨基与吡喃己糖的 Amadori 重排物或吡喃己糖基 - 吡喃己糖,



而 R^{10} 为 $-H$ 、 $-COOH$ 、 $-CO-R^{11}$ 、 CH_2-R^{11} 或 $-CH_2-OH$, 其中, R^{11} 为哌嗪基、吗啉代、哌啶子基或 $-N(R^{12})-R^{13}$, 其中 R^{12} 和 R^{13} 各自独立地为氢或低级烷基;

附带条件是, A 与 B 、 B 与 C 、 C 与 D 、 D 与 E 、或 p 为 1 时 E 与 F 之间的至少一个酰胺键被氨基亚甲基取代, 或者当 p 为 0 时, E 是 $-NH-CH(CH_2-R^3)-CH_2-R^4$, 或者当 p 为 1 时, R^{10} 是 CH_2-R^{11} ;

或其可以药用的盐。

2. 如权利要求 1 所述的化合物, 其特征在于 p 为 1。

3. 如权利要求 1 所述的化合物, 其特征在于 A 为 His、 D -

Ala 或咪唑基丙酸。

4.如权利要求 1 所述的化合物, 其特征在于 B 为 D - Trp 或 D - 2Nal.

5.如权利要求 1 所述的化合物, 其特征在于 C 为 Ala.

6.如权利要求 1 所述的化合物, 其特征在于 D 为 N - 苜基甘氨酸或 Trp.

7.如权利要求 1 所述的化合物, 其特征在于 E 为 D - Phe.

8.如权利要求 1 所述的化合物, 其特征在于 $v=6$, 而 $R^7 = -NH_2$.

9.如权利要求 1 所述的化合物, 其特征在于 R^{10} 为 $-CONH_2$ 、 $-CH_2-OH$.

10.如上述权利要求中任一项所述的化合物, 选自下列化合物:

H-His Ψ (CH₂NH)D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂

H-His-D-Trp Ψ (CH₂NH)Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂

H-His-D-Trp-Ala Ψ (CH₂NH)Trp-D-Phe-Lys-NH₂

H-His-D-Trp-Ala-Trp Ψ (CH₂NH)D-Phe-Lys-NH₂

H-His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe Ψ (CH₂NH)Lys-NH₂

H-D-Ala-D-2Nal-Ala Ψ (CH₂NH)Trp-D-Phe-Lys-NH₂

H-D-Ala-D-2Nal-Ala-Trp-D-Phe Ψ (CH₂NH)Lys-NH₂

(3-(4-咪唑基)丙酰基)-D-2Nal-Ala-Trp-D-Phe Ψ (CH₂NH)

Lys-OH

(3-(4-咪唑基)(丙酰基)-D-2Nal-Ala-Trp-D-Phe Ψ (CH₂NH)
Lys-NH₂
(3-(4-咪唑基)丙烯酰)-D-2Nal-Ala-Trp-D-Phe Ψ
(CH₂NH) Lys-NH₂
H-D-Ala-D-Phe-Ala-Trp-D-Phe Ψ (CH₂NH) Lys-NH₂
(2R)-(H-D-Ala-D-Phe-Ala-Trp-NH)-3-苯丙胺
(2S)-(H-D-Ala-D-2Nal-Ala Ψ (CH₂NH) Trp-D-Phe-NH)-6-
氨基己醇
H - D-Ala-D-2Nal-Ala Ψ (CH₂NH)Trp-D-Phe-NH₂
4-(H-D-Ala-D-2Nal-Ala Ψ (CH₂NH)Trp-D-Phe-NH)丁胺
(2R)-(H-D-Ala-D-2Nal-Ala-Trp-NH)-3-苯丙胺
((2R)-(H-D-Ala-D-2Nal-Ala-Trp-NH)-3-苯丙氨基)己胺
(2R)-(H-D-2Nal-Ala-N-Bzl-Gly-NH)-3-苯丙胺
(2R)-(H-D-Ala-D-2Nal-Ala-N-Bzl-Gly-NH)-3-苯丙胺
H-Aib-D-2Nal-Ala-N-Bzl-Gly-D-Phe Ψ (CH₂NH)Lys-NH₂
(2S)-((3-(4-咪唑基)丙酰基)Ψ (CH₂NH)D-Phe-Ala-Trp-D-Phe-
NH)-6-氨基己醇
(2S)-((3-(4-咪唑基)丙酰基)-D-Phe Ψ (CH₂NH)Ala-Trp-
D-Phe-NH)-6-氨基己醇
(2S)-((3-(4-咪唑基)丙酰基)-D-Phe-Ala Ψ (CH₂NH)Trp-D-
Phe-NH)-6-氨基己醇
(2S)-((3-(4-咪唑基)丙酰基)-D-Phe-Ala-Trp Ψ (CH₂NH)D-
Phe-NH)-6-氨基己醇
(2S)-(2R)-((3-(4-咪唑基)丙酰基)-D-Phe-Ala-Trp-NH)-3-苯丙

氨基)-6-氨基己醇

3-((3-(4-咪唑基(丙酰基) - D - Trp-Ala Ψ (CH₂NH)Trp-D-Phe-NH)丙胺

(2S)-((3-(4-咪唑基)丙酰基)-D-Phe-Ala-Trp-D-Phe Ψ (CH₂NH)NH)-6-氨基己醇

(2S)-((3-(4-咪唑基)丙酰基)-D-Trp-Ala Ψ (CH₂NH)Trp-D-Phe-NH)-6-氨基己醇

3-((3-(4-咪唑基)丙酰基) - D - Trp-Ala Ψ (CH₂NH)Trp-D-Phe-NH)丙胺

H-D-Ala-D-2Nal-Ala-N-Bzl-Gly-D-Phe Ψ (CH₂NH)Lys-NH₂

H-Aib-D-2Nal-Ala-N-Bzl-Gly-D-Phe Ψ (CH₂NH₂)

11.一种药用组合物，包括作为活性成分的通式 I 的化合物或其可以药用的盐以及可以药用的载体或稀释剂。

12.如权利要求 11 所述的组合物，其单位剂量形式含有约 10 - 约 200mg 通式 I 的化合物或其可以药用的盐。

13.一种用于激发垂体释放生长激素的药用组合物，该组合物包括作为活性成分的通式 I 的化合物或其可以药用的盐以及可以药用的载体或稀释剂。

14.将通式 I 的化合物或其可以药用的盐用于制备用来激发垂体释放生长激素的药物的用途。

说明书

具有生长激素释放特性的化合物

本发明涉及新的肽衍生物，含有该衍生物的组合物及其用于治疗因生长激素缺乏所致的医学疾病的用途。

生长激素是一种能激发所有能生长的组织生长的激素。此外，还知道生长激素对代谢过程有许多作用，例如激发蛋白质合成和游离脂肪酸活动，并引起从碳水化合物到脂肪酸代谢的能量代谢的转换。生长激素的缺乏会导致许多严重的医学疾病，如侏儒。

生长激素是从垂体中释放出来的。而释放过程受到多种激素和神经递质直接或间接地严格控制。生长激素的释放可用生长激素释放激素（GHRH）激发，并用生长激素抑制素抑制。在两种情况下该激素都是从下丘脑中释放出的，但其作用主要是通过位于垂体中的特异受体进行调节。可激发垂体释放生长激素的其它化合物也已公开。如精氨酸、L-3,4-二羟苯丙氨酸（L-Dopa）、胰高血糖素、加压素、PACAP（垂体腺苷酰环化酶活化肽）、草毒受体激动剂和一种合成的六肽，GHRP（生长激素释放肽）通过直接作用于垂体或通过影响下丘脑释放GHRH和/或生长激素抑制素而释放内源生长激素。

对需要提高生长激素的水平或症状来说，由于生长激素的蛋白质性质，使得除肠胃外使用的任何用法都没有活性。另

外，其它直接作用的天然促分泌素如 GHRH 和 DACAP 是较长的多肽，因此，口服这类化合物也是没有活性的。

在本发明之前，已经有人提出用较短的肽来提高哺乳动物的生长激素水平，例如以下的专利文件：EP18072，EP83864，WO89/07110，WO89/01711，WO89/10933，WO88/9780，WO83/02272，WO 91/18016，WO 92/01711 和 WO93/04081。

生长激素释放肽或肽衍生物的组成，对于其生长激素释放能力及其生物利用率来说是重要的。因此，本发明的目的是提供具有生长激素释放特性的肽，相对同一类型的已知肽而言，它具有改善了的性能。

因此，本发明涉及一种如通式 I 所示的化合物：



其中

P 为 0 或 1；

A 为咪唑基 - C₁₋₆ 链烷酸，咪唑基 - C₁₋₆ 链烯酸，氨基 - C₁₋₆ 链烷酸或氨基 - C₁₋₆ 链烯酸或从下列 H - His、H - Ala、H - D - Ala、H - (β - 丙氨酸)、H - Aib、肌氨酸和 Gly 几种氨基酸中选择出的一种 L - 或 D - α - 氨基酸；

B 为 D - Trp, D-Nal 或 D - Phe；

C 为 Ala、Ser 或 Gly；

D 为 Trp、Phe、β - (2 - 噻吩基) - 丙氨酸或芳烷基甘氨酸；

当 p 为 1 时 E 为 D - Phe，当 p 为 0 时 E 为 - NH - CH (CH₂

- R³) - CO - R⁴ 或 - NH - CH (CH₂ - R³) - CH₂ - R⁴,
其中,

R³ 为苯基,

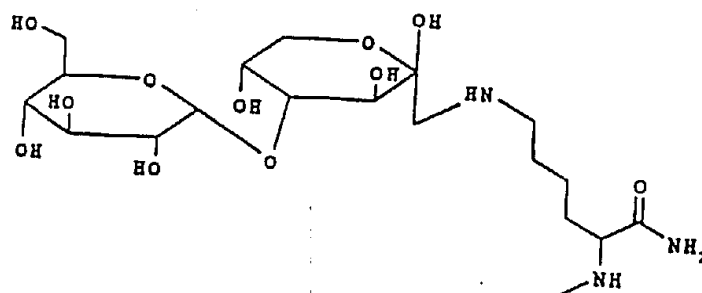
而 R⁴ 为哌嗪基 (piperazino)、吗啉代、哌啶子基、OH 或
- N (R⁵) R⁶, 其中 R⁵ 和 R⁶ 各自独立地为氢或低级烷基;

当 p 为 1 时, F 为 - NH - CH (R¹⁰) - (CH₂)_v - R⁷)

其中

v 为 0 或 1 - 8 之间的一个整数, 而

R⁷ 为咪唑基、哌嗪基、吗啉代、哌啶子基或 - N (R⁸) -
R⁹, 其中 R⁸ 和 R⁹ 各自独立地为 氢或低级烷基, 或氨基与吡喃
己糖的Amadori重排物或下式的吡喃己糖基 - 吡喃己糖



而 R¹⁰ 为 - H、- COOH、- CO - R¹¹、CH₂ - R¹¹ 或 - CH₂
- OH, 其中 R¹¹ 为哌嗪基、吗啉代、哌啶子基或 - N (R¹²) -
R¹³, 其中 R¹² 和 R¹³ 各自独立地为氢或低级烷基;

附带条件是, A 与 B、B 与 C、C 与 D、D 与 E、或 p 为
1 时 E 与 F 之间的至少一个酰胺键被氨基亚甲基取代, 或者当 p
为 0 时, E 为 - NH - CH (CH₂ - R³) - CH₂ - R⁴, 或者当

p 为 1 时, R^{10} 为 $CH_2 - R^{11}$;

或其可以药用的盐。

据信, 式 I 的肽衍生物对于胃肠酶或血浆酶的蛋白酶降解作用有较好的抵抗作用, 因为用氨基亚甲基 ($-CH_2NH$) 取代了酰胺键 ($-CONH-$) 或是引入了 N-芳烷基甘氨酸。与现有文献中推荐的肽的生物利用率相比, 本发明肽衍生物对蛋白酶降解作用抵抗力的提高, 可望能改善其生物利用率。

在本文中, “低级烷基”一词用于表示具有 1 - 6 个碳原子的烷基, 具体来说有甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、戊基或己基。

在式 I 化合物的一个优选实施方案中, p 为 1。在式 I 化合物的另一个优选实施方案中, A 为 His、D-Ala 或咪唑基丙酸。B 最好为 D-Trp 或 D-2Nal。C 最好为 Ala。当 D 表示 N-芳烷基甘氨酸时, 它最好是 N-苄基甘氨酸。D 最好为 Trp。E 最好为 D-Phe。在 F 的含义内, v 最好为 3 - 6, 而 R^7 最好为 $-NH_2$ 。 R^{10} 最好为 $-CONH_2$, $-CH_2OH$ 。

本发明发特殊化合物的例子如下:

H-His Ψ (CH_2NH)D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys- NH_2
H-His-D-Trp Ψ (CH_2NH)Ala-Trp-D-Phe-Lys- NH_2
H-His-D-Trp-Ala Ψ (CH_2NH)Trp-D-Phe-Lys- NH_2
H-His-D-Trp-Ala-Trp Ψ (CH_2NH)D-Phe-Lys- NH_2
H-His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe Ψ (CH_2NH)Lys- NH_2
H-D-Ala-D-2Nal-Ala Ψ (CH_2NH)Trp-D-Phe-Lys- NH_2
H-D-Ala-D-2Nal-Ala-Trp-D-Phe Ψ (CH_2NH)Lys- NH_2

(3-(4-咪唑基)丙酰基)-D-2Nal-Ala-Trp-D-Phe Ψ (CH₂NH)
Lys-OH

(3-(4-咪唑基)(丙酰基)-D-2Nal-Ala-Trp-D-Phe Ψ (CH₂NH)
Lys-NH₂

(3 - (4 - 咪唑基) 丙烯酰) -D-2Nal-Ala-Trp-D-Phe Ψ
(CH₂NH) Lys-NH₂

H-D-Ala-D-Phe-Ala-Trp-D-Phe Ψ (CH₂NH) Lys-NH₂
(2R)-(H-D-Ala-D-Phe-Ala-Trp-NH)-3-苯丙胺
(2S)-(H-D-Ala-D-2Nal-Ala Ψ (CH₂NH) Trp-D-Phe-NH)-6-
氨基己醇

H - D-Ala-D-2Nal-Ala Ψ (CH₂NH)Trp-D-Phe-NH₂
4-(H-D-Ala-D-2Nal-Ala Ψ (CH₂NH)Trp-D-Phe-NH)丁胺
(2R)-(H-D-Ala-D-2Nal-Ala-Trp-NH)-3-苯丙胺
((2R)-(H-D-Ala-D-2Nal-Ala-Trp-NH)-3-苯丙氨基己胺
(2R)-(H-D-2Nal-Ala-N-Bzl-Gly-NH)-3-苯丙胺
(2R)-(H-D-Ala-D-2Nal-Ala-N-Bzl-Gly-NH)-3-苯丙胺
H-Aib-D-2Nal-Ala-N-Bzl-Gly-D-Phe Ψ (CH₂NH)Lys-NH₂
(2S)-((3-(4-咪唑基)丙酰基) Ψ (CH₂NH)D-Phe-Ala-Trp-D-Phe-
NH)-6-氨基己醇

(2S)-((3-(4-咪唑基)丙酰基) - D - Phe Ψ (CH₂NH)Ala-Trp-
D-Phe-NH)-6-氨基己醇

(2S)-((3-(4-咪唑基)丙酰基)-D-Phe-Ala Ψ (CH₂NH)Trp-D-
Phe-NH)-6-氨基己醇

(2S)-((3-(4-咪唑基)丙酰基)-D-Phe-Ala-Trp Ψ (CH₂NH)D-

Phe-NH)-6-氨基己醇

(2S)-(2R)-((3-(4-咪唑基)丙酰基)-D-Phe-Ala-Trp-NH)-3-苯丙
氨基)-6-氨基己醇

3-((3-(4-咪唑基(丙酰基) - D - Trp-Ala Ψ (CH₂NH)Trp-D-
Phe-NH)丙胺

(2S)-((3-(4-咪唑基)丙酰基)-D-Phe-Ala-Trp-D-Phe Ψ
(CH₂NH)-6-氨基己醇

(2S)-((3-(4-咪唑基)丙酰基)-D-Trp-Ala Ψ (CH₂NH)Trp-D-
Phe-NH)-6-氨基己醇

3-((3-(4-咪唑基)丙酰基) - D - Trp-Ala Ψ (CH₂NH)Trp-D-
Phe-NH)丙胺

H-D-Ala-D-2Nal-Ala-N-Bzl-Gly-D-Phe Ψ (CH₂NH)Lys-NH₂

H-Aib-D-2Nal-Ala-N-Bzl-Gly-D-Phe Ψ (CH₂NH₂)

缩略语

D - 2Nal: D - 2 - 萘基丙氨酸

N - Bzl: N - 苄基甘氨酸

H - Aib: H - 氨基异丁酸

式 I 的化合物可用常规的液相或固相肽合成方法进行制备。
例如, 固相合成可大致按 Stewart 和 Young 所公开的方法进行

(Solid Phase Peptide

Synthesis, 2nd. Ed. Rockford, Illinois, USA, 1976) . 而液相肽合成则

可大致按 Bodansky 等人的方法进行 (Peptide

Synthesis, 2nd. Ed. New York, New York, USA, 1976) .

可按照 Y. Sasaki 和 D. H. Coy 所公开的方法 (Peptides

8(1),1987,pp.119-121), 将氨基亚甲基作为酰胺键的取代基引入。

含有由氨基-或二-吡喃己糖衍生的氨基的肽衍生物, 可用 Amadori 重排法进行制备, 该方法基本上是 R.Albert 等人所公开的方法 (Life Sciences 53, 1993, pp.517 - 525)。一或二吡喃己糖的适当例子有: 葡萄糖、半乳糖、麦芽糖、乳糖或纤维二糖。用作上述合成原料的衍生物可以由商业渠道获得, 如有必要, 还可引入适当的保护基。

式 I 化合物的可以药用的酸加成盐, 包括将这种肽与无机酸或有机酸反应所生成的盐, 例如, 可选用的酸有氢氯酸、氢溴酸、硫酸、乙酸、磷酸、乳酸、马来酸、邻苯二甲酸、柠檬酸、戊二酸、葡糖酸、甲磺酸、水杨酸、丁二酸、酒石酸、甲苯磺酸、三氟乙酸、氨基磺酸和富马酸。

另外, 本发明涉及一种药用组合物, 它含有作为活性成分的通式 I 的化合物或其可以药用的盐, 以及可以药用的载体或稀释剂。

含有本发明化合物的药用组合物可用常规技术制备, 如在 Remington's Pharmaceutical Sciences (1985) 中所公开的方法。可将该组合物制成常规剂型, 如胶囊、片剂、烟雾剂、溶液、悬浮液或局部用药。

所用的药用载体或稀释剂, 可以是常规的固体或液体载体。固体载体的例子有乳糖、石膏粉、蔗糖、环糊精、滑石、明胶、琼脂、果胶、阿拉伯胶、硬脂酸镁、硬脂酸或纤维素的低级烷基醚。液体载体的例子有糖浆、花生油、橄榄油、磷脂、脂肪酸、脂肪酸胺、聚氧乙烯和水。

同样地，所述载体或稀释剂可包括本领域任何已知缓释材料，如单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯，单独使用或与蜡混合后使用。

如果将固体载体用于口服，可将该制剂压片、以粉状或粒状形式放在硬明胶囊中，或制成片剂或锭剂。固体载体的用量可以有较大的变化，但通常为约 25mg-约 1g。

用常规的压片技术制成的典型片剂可包括：

芯部：

活性化合物（游离化合物或其盐）	100mg
胶态 SiO ₂ (Aerosil)	1.5mg
纤维素，微晶纤维素（Avicel）	70mg
改性纤维素胶（Ac-Di-Sol）	7.5mg

硬脂酸镁

涂层：

HPMC	约 9mg
*Mywacett 9-40T	约 0.9mg

*将酰化的单酸甘油酯用作涂膜的增塑剂。

如果采用的是液体载体，可将该制剂制成糖浆、乳剂、软明胶囊或无菌注射液，如水成或非水成液体悬浮液或溶液。

为了鼻用，该制剂可含有溶于或悬浮于液体载体，尤其是水成载体中的式 I 化合物，用作烟雾剂。所述载体可含有诸如增溶剂，如丙二醇；表面活性剂，如胆汁酸盐或聚氧乙烯高级醇醚；吸收增强剂，如卵磷脂（磷脂酰胆碱）或环糊精；或防腐剂，如对羟基苯甲酸酯之类的添加剂。

通常，本发明的化合物被分成单位剂量形式，每单位剂量含有 0.0001 - 100mg 的活性成份和药用载体。

本发明化合物的适用剂量为 1 - 500mg/天，例如，当作为药物给患者，如病人使用时，每剂约 100mg。

业已证实，通式 I 的化合物具有在体内释放内源生长激素的能力。因此，可将该化合物用于治疗需要提高血浆生长激素含量的疾病，如生长激素缺乏的病人或老年患者或牲畜。

因此，一方面，本发明涉及一种用于激发垂体释放生长激素的药用组合物，该组合物包括作为活性成分的通式 I 的化合物或其可以药用的盐，以及可以药用的载体或释释剂。

另一方面，本发明涉及一种激发垂体释放生长激素的方法，该方法包括给需要用药的對象使用有效剂量的通式 I 化合物或其可以药用的盐。

再一方面，本发明涉及将通式 I 的化合物或其可以药用的盐用于制备用来激发垂体释放生长激素的药物的用途。

本领域技术人员都知道，生长激素在人体上的现有和潜在的用途是变化的和多种多样的。假定式 I 的化合物可用于激发垂体释放生长激素的目的，那么它就具有与生长激素本身类似的作用或用途。生长激素的用途可总结为如下几方面：激发老年人释放生长激素；预防糖皮质激素的代谢副作用，治疗骨质疏松症，激活免疫系统，加快伤口愈合，加快骨折的恢复，治疗生长停滞，治疗因生长停滞所致的肾衰竭或肾机能不全，治疗生理性身材矮小，包括生长激素缺乏的儿童和因慢性病造成的身材矮小，治疗肥胖及与肥胖相关的生长停滞，治疗与 Prader-Willi 综合症和 Turner's

综合症相关的生长停滞；加速烧伤病人的恢复并缩短住院治疗时间；治疗子宫生长停滞，骨骼发育异常，肾上腺皮质机能亢进和 Cushing's 综合症；诱导脉冲式生长激素释放；恢复紧张病人的生长激素，治疗骨软骨发育不良， Noonan's 综合症，精神分裂症，压抑， Alzheimer's 病，延迟的伤口愈合和精神失常，治疗肺机能障碍和呼吸器依赖症，减轻大手术之后的蛋白质代谢反应，减轻由慢性病如癌症或 AIDS 引起的恶病质和蛋白质减少；治疗胰岛素过多症，包括在胰岛素细胞增殖症，用于排卵诱导的辅助治疗；激发胸腺发育并防止与年龄相关的胸腺机能下降，治疗免疫抑制患者，改善肌肉强度和肌肉活动性，保持皮肤厚度，代谢的体内平衡，虚弱老年人的肾内环境稳定，激活成骨细胞，骨重塑和软骨生长，激发伴生动物的免疫系统并治疗伴生动物的衰老疾病，牲畜的生长促进和激发绵羊的羊毛生长。

对于上述治疗而言，剂量取决于所采用的式 I 化合物、使用方式和期望的治疗。不过，给病人或动物使用的一般剂量为每天 0.0001 - 100mg/kg 体重，以获得内源生长激素的有效释放。通常适于口服或鼻用的剂型包括与可以药用的载体或稀释剂混合的约 0.0001 - 100mg，最好是约 0.001 - 50mg 的式 I 化合物。

式 I 化合物能以可以药用的酸加成盐形式或必要时碱金属或碱土金属或低级烷基铵盐形式使用。据认为，这种盐形物具有与游离碱相近似的活性。

或者，本发明的药用组合物也可含有与一种或多种具有不同活性的化合物，如抗菌素或其它药理活性材料混合的式 I 化合物。它可以是另一种促分泌素，如 GHRP (1 或 6) 或 GHRH 或其类

似物，生长激素或其类似物或生长调节素，如 IGF - 1 或 IGF - 2。

使用途径可以是任何能把所述活性化合物有效地输送到适当的或期望的作用位点的途径，如经口、鼻或肠胃外使用，口服最佳。

式 I 化合物除药用之外，还可将其用作研究生长激素释放调节的体外工具。

式 I 化合物还可被用作评估垂体的生长激素释放能力的体内工具。例如，在对人体使用这种化合物之前和之后提取血清样品，可以分析生长激素。通过比较各血清样品中的生长激素可直接测出患者垂体释放生长激素的能力。

可将式 I 化合物用于商业上重要的动物，以提高其生长速度和程度，并用于提高产乳量。

药理方法

可在体外评估式 I 化合物对初生大鼠亲躯体细胞释放生长激素影响的效力和能力。

可基本上按照以前公开的方法（Chen 等，*Endocrinology* 1991,129,3337-3342 和 Chen 等，*Endocrinology*.1989,124,2791-2798）制备大鼠初生亲躯体细胞。简言之，通过断头杀死大鼠，迅速取出垂体。所得到的垂体用溶于 Hanks 平衡盐溶液中的 0.2% 的胶原酶和 0.2% 的透明质酸酶消化。将细胞悬浮于含有 0.37% NaHCO_3 、10% 马血清、2.5% 胎牛血清、1% 非必需氨基酸、1% 谷氨酰胺和 1% 青霉素/链霉素的 Dulbecco 改进的 Eagle 培养基中，并调整至 1.5×10^5 细胞/ml。将 1ml 的该悬浮液放入

24 眼浅盘的每个眼中，并在进行释放实验之前放置 2 - 3 天。

在该实验的第一天，用含有 25mM HEPES, pH7.4 的上述培养基洗涤细胞两次。通过加入含有 25mM HEPES 和试验化合物的培养基引发生长激素的释放。在 37 °C 培养 15 分钟。培养之后通过标准的 RIA 测定释放到培养基里的生长激素。

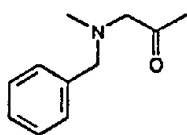
可按照以前公开的方法 (Bercu 等, *Endocrinology* 1991,129,2592-2598)，通过其对戊巴比妥麻醉的雌性大鼠生长激素释放的体内影响评价式 I 化合物在体内的作用。简而言之，以 50mg/kg 戊巴比妥的剂量 ip 麻醉成年雌性 Sprague-Dawley 大鼠。待大鼠完全麻醉之后，将气管插管和导管植入其颈动脉和颈静脉中。经过 15 分钟的恢复之后，在 0 计时提取血样。iv 使用垂体促分泌素，并将动脉血样在冰上放置 15 分钟，然后以 12, 000 × g 离心 2 分钟。倒出血清并用标准 RIA 测定生长激素的含量。

下面的实施例将对本发明做进一步说明，但从任何意义上讲都不是对要求保护的发明范围的限定。

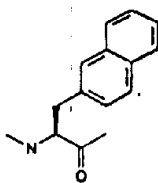
在本说明书中，使用了如下的缩略语：

用于非天然氨基酸的缩略语：

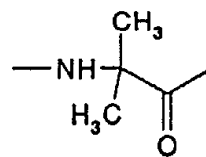
N-Bzl-Gly:



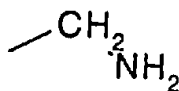
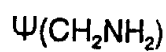
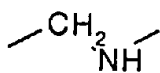
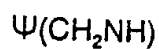
2Nal:



Aib:

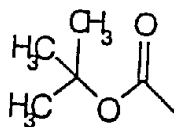


用于肽键取代基的缩略语：

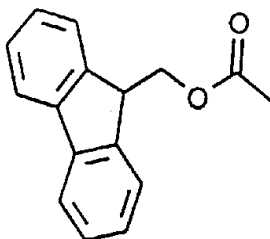


用于保护基的缩略语:

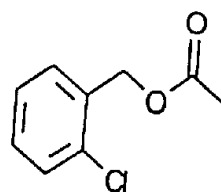
Boc-



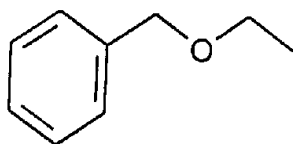
Fmoc-



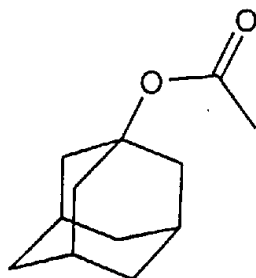
Cl-Z-



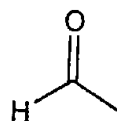
Bom-



Adoc-



For-



例 1

H - His-D-Trp $\Psi(\text{CH}_2\text{NH})$ Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂

按照 Fmoc 方法, 用生产商提供的 FastMoc UV 方案在 Applied Biosystems 431A 肽合成仪上以 0.25mmol 的规模合成肽树脂 H-Ala-Trp-D-Phe-Lys-Res in, 所采用的是 HBTU (2-(1H-苯并三唑-1-基)-1, 1, 3, 3-四甲基脲六氟磷酸) 介导的在 NMP (N-甲基吡咯烷酮) 里的偶联, 并 UV 监测 Fmoc 保护基

的去保护。用于上述合成的原始树脂为 470mg 具有 0.53mmol/g 取代度的 4 - (2',4'-二甲氧苯基 - Fmoc-氧甲基) - 苯氧基树脂 (Novabiochem AG Switzerland,cat.#: 01 - 64 - 0013)。所用的被保护的氨基酸衍生物是 Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-D-Phe-OH, Fmoc-Trp-OH 和 Fmoc-Ala-OH。

按照 Sasaki, Y. 和 Coy, D.H. 的方法 (PEPTIDES 8 (1) 119 - 121, 1987) 将 - CH₂NH - 肽键等配物引入。

Fmoc-D-Trp-醛是按照 Fehrentz, J.A. 和 Castro, B. 的方法 (SYNTHESIS 676 - 678, 1983),

用 399mg 相应的 N, O - 异羟肟酸二甲酯制备而成的。将粗制的醛溶于用 DMF (二甲基甲酰胺) 配制的 8ml 1 % 乙酸中, 并分成两部分。将第一部分在室温下加入溶于 8ml 用 DMF 配制的 1 % 乙酸溶液中的 400mg (约 0.2mmol) H-Ala-Trp-D-Phe-Lys(Boc)-Resin 的搅动的浆体中。然后在 60 分钟内加入溶于 1ml DMF 中的 40mg NaCNBH₃ (纯度 85 %), 并再持续搅拌 60 分钟。此后, 分离树脂, 并经过滤漏斗用由 DMF 配制的 1 % 乙酸洗涤。将所得树脂重新悬浮于 5ml 用 DMF 配制的 1 % 乙酸中, 并加入另一部分 Fmoc-Ala - 醛。同样在室温下, 在 60 分钟之内加入溶于 1ml DMF 中的 40mg NaCNBH₃ (纯度 85 %), 并将该混合物搅拌 18 小时。

在这一还原性烷基化步骤之后, 分离所述肽树脂, 并在过滤漏斗上用溶于 DMF 中的 1 % 的乙酸洗涤, 按照上述方法, 用保护的氨基酸衍生物 Fmoc-His(Trt)-OH, 通过肽合成仪完成链延长。

通过将所述肽树脂与由 3ml TFA (三氟乙酸)、225mg 苯酚、

75 μ l 乙二硫醇、150 μ l 苯硫基甲烷和 150 μ l H_2O 组成的混合物一起在室温下搅拌 240 分钟，将肽从其上面裂解下来。将裂解混合物过滤，并用氮气流将滤液浓缩成油状。用 45ml 乙醚将粗制的肽从该油状物中沉淀，并用 45ml 的乙醚洗涤 3 次。

通过在装有 7 μ C - 18 二氧化硅的 25mm \times 250mm 的柱上进行半制备 HPLC，纯化上述粗制肽。该柱用溶于 0.05M (NH_4)₂SO₄ 的、并用 4M H_2SO_4 调至 pH2.5 的 21% CH_3CN 平衡。将干燥后的粗制肽溶于 5ml 溶于 H_2O 中的 70% CH_3CN /0.1%TFA 中，并用水稀释至 50ml。将 20ml 的该溶液稀释至 90ml，并加注到柱上，在 40 $^{\circ}C$ 温度下，在 47 分钟之内以 10ml/分的流速，用溶于 0.05M (NH_4)₂SO₄ 中的 21% - 31% CH_3CN (pH2.5) 梯度溶液将其从柱上洗脱。收集含有肽的部分，并用 3 倍体积的 H_2O 稀释，然后通过用 0.1% TFA 平衡过的 Sep-Dak C₁₈ 柱 (Waters Part #:51910)。然后用含有 0.1% TFA 的 70% CH_3CN 进行洗脱，并在用水对洗脱液进行稀释之后分离提纯的肽。产量为 6.55mg。

通过氨基酸分析 (肽含量和氨基酸组成)、分析 RP - HPLC (保留时间) 和 PDMS (等离子体解吸质谱) (分子量) 鉴定所得到的最终产物。在该方法的实验误差 (PDMS: \pm 0.9amu, 氨基酸分析 \pm 10%) 之内，氨基酸分析和 PDMS 与期待的结构相符合。

采用 214nm 的 UV 检测和一个 Vydac 218TP54 4.6 \times 250mm 5 μ C - 18 二氧化硅柱 (The Separation Group, Hesperia, USA) 进行 RP - HPLC 分析并在 42 $^{\circ}C$ 以 1ml/分钟的速度洗脱。采用两种不同的洗脱条件:

A1: 用溶于由 0.1M (NH₄)₂SO₄ 组成的缓冲液中、并用浓硫酸调至 pH2.5 的 5% CH₃CN 平衡层析柱, 并在 50 分钟之内, 用溶于同一缓冲液中的 5% - 60% 的 CH₃CN 梯度液进行洗脱。

B1: 用 5% CH₃CN/0.1% TFA/H₂O 平衡层析柱, 并在 50 分钟之内, 用 5% CH₃CN/0.1% TFA/H₂O 至 60%CH₃CN/0.1%TFA/H₂O 梯度液洗脱。

发现采用洗脱条件 A1 和 B1 的保留时间分别为 22.01 分钟和 23.08 分钟。

例 2

H-His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe Ψ (CH₂NH)Lys-NH₂

H-Lys (2 - Cl-Z) - Resin 是按照 Boc 方法, 用生产商提供的单偶联方案, 以 0.5mmol 的规模, 在 Applied Biosystems 430A 肽合成仪上, 用 660mg 具有 0.72mmol/g 取代度的 4 - 甲基 BHA 树脂 (Bissendorf Biochemicals,Hannover,Germany.cat.#: RMIS50) 和 B - Lys(Cl-Z)-OH 合成的, 采用的是与预先制成的溶于 DMF 中的对称酐的单偶联。该方案被修改成具有 60 分钟的偶联时间。

采用与例 1 类似的方法引入 - CH₂NH - 肽键等配物。使用 675mg H-Lys(Cl-Z)树脂和由 616mg 相应的 N, O - 异羟肟酸二甲酯制成的 Boc-D-Phe-酐。

在这一还原性烷基化步骤之后, 分离树脂并在过滤漏斗上用溶于 DMF 中的 1% 的乙酸洗涤。按照上述方法, 用保护的氨基酸衍生物 Boc-Trp(For)-OH, Boc-Ala-OH、Boc-D-Trp(For)-OH 和 Boc-His(Bom)-OH 通过肽合成仪完成链延长。

通过与 5ml HF 和 500 μ l m - 甲酚组成的混合物搅拌 75 分钟，将肽从 391mg 的肽树脂上裂解下来。在 0 $^{\circ}$ C 用氮气流将 HF 蒸发掉。用 50ml 乙醚将肽与树脂一起从残余的油中沉淀出来，用 50ml 乙醚洗涤 2 次，用 2 \times 2ml TFA 从树脂中提取，并用 50ml 乙醚从合并的 TFA 提取液中沉淀，再用 50ml 的乙醚洗涤 2 次。

干燥之后，通过将所述肽溶于含有 4ml 乙醇胺的 64ml 6M 盐酸胍中，并在 0 $^{\circ}$ C 搅拌 5 分钟切除色氨酸上的甲酰基。此后，通过加入 4ml 的乙酸中和该混合物，然后用 140ml 的 H₂O 稀释。

采用与例 1 相同的方法，通过将反应混合物直接加注到层析柱上对所得到的粗制肽进行半制备 HPLC。产量为 20.6mg。

按照例 1 所述方法对最终产物进行鉴定。

采用 A1 和 B1 条件的 RP - HPLC 分析所得到的保留时间分别为 21.28 分钟和 23.17 分钟。

例 3 - 5

例	肽	用类似于以下实施例的方法进行制备	RP - HPLC 保留时间	
			条件 A1 (例 1)	条件 B1 (例 1)
3	H-His Ψ (CH ₂ NH)D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	2	20.42	22.9
4	H-His-D-Trp-Ala-Trp Ψ (CH ₂ NH)D-Phe-Lys-NH ₂	1	18.97	21.3
5	H-His-D-Trp-Ala Ψ (CH ₂ NH)Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	2	18.87	21.08

例 6

(2R)-(H-D-Ala-D-2Nal-Ala-Trp-NH)-3-苯丙胺

按照 Fehrentz, J.-A. 和 Castro, B. 的方法 (SYNTHESIS 676 - 678, 1983), 由 385mg 的相应 N, O - 异羟肟酸二甲酯制成 Fmoc-D-Phe-醛。

用溶于 DMF 中的 20% 吡啶, 对取代度为 0.43mmol/g 的 580mg 4 - (2',4'-二甲氧苯基 - Fmoc - 氨基甲基) - 苯氧基树脂

(Novabiochem AG Switzerland, Cat.#: 01 - 64 - 0013) 进行去保护 20 分钟, 并用 DMF 和溶于 DMF 中的 1% 乙酸洗涤。

将第一部分 Fmoc-D-Phe-醛和溶于 1ml DMF 中的 58mg NaCNBH₃ (纯度 85%) 溶液加入脱保护的树脂中, 并在室温下将该浆体搅拌 75 分钟。此后, 在过滤漏斗上分离该树脂, 并用溶于 DMF 中的 1% 乙酸洗涤。将第二部分 Fmoc-D-Phe-醛和溶于 1ml DMF 中的 58mg NaCNBH₃ (纯度 85%) 一起加入树脂中, 并在室温下搅拌该混合物 18 小时, 在过滤漏斗上分离树脂, 并用溶于 DMF 中的 1% 乙酸、DMF、6: 4 的 DCM/甲醇和 DCM (二氯甲烷) 洗涤。

按照例 1 所述方法及保护的氨基酸衍生物 Fmoc-Trp-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-D-2Nal-OH 和 Fmoc-D-Ala-OH, 用上述树脂在肽合成仪上完成链延长。

将肽从 600mg 所得肽树脂上切下来。将所得粗制肽溶于 50ml H₂O 中, 并通过半制备 HPLC 提纯 25ml 的上述溶液, 再用与例 1 相似的方法进行鉴定。产量为 10.9mg。

用 A1 和 B1 条件进行 RP - HPLC 分析所得到的保留时间分

别为 27.98 分钟和 29.45 分钟.

例 7 - 12

例	肽	用类似于以下实 施例的方法进行 制备	RP - HIPC 保留时间	
			条件 A1 (例 1)	条件 B1 (例 1)
7	H-D-Ala-D-2Nal-Ala-Trp- D-Phe Ψ (CH ₂ NH)Lys-NH ₂	1	26.00	27.02
8	H-D-Ala-D-Phe-Ala-Trp- D-Phe Ψ (CH ₂ NH)Lys-NH ₂	1	22.02	23.30
9	3-(4-咪唑基)丙酰基-D- 2Nal-Ala-Trp-D-Phe Ψ (CH ₂ NH)Lys-NH ₂	1	26.33	27.70
10	3-(4-咪唑基)丙烯酰-D- 2Nal-Ala-Trp-D-Phe Ψ (CH ₂ NH)Lys-NH ₂	1	26.93	28.15
11	(2S)-(H-D-Ala-D-2Nal-Ala- Trp-D-Phe-NH)-6-氨基己 胺	6	25.33	26.08
12	H-D-Ala-D-2Nal-Ala Ψ (CH ₂ NH)Trp-D-Phe-Lys- NH ₂	1	23.62	25.07

例 13

(2S)-((3-(4-咪唑基)丙酰基)-D-Trp-Ala Ψ (CH₂NH)Trp-D-
Phe-NH)-6-氨基己醇

采用类似于例 1 所述的方法, 以 1mmol 的规模合成肽树脂 3

- (1-Adoc-4-咪唑基)丙酰基-D-Trp-Ala Ψ(CH₂NH)Trp-D-Phe-Lys(Boc)-Sasrin 树脂(Adoc 是 1-金刚烷基-羧基的缩写), 所不同的是, 采用具有 0.87mmol/g 取代能力的 Sasrin 树脂(2-甲氧基-4-烷氧苄基醇树脂)(Bachem, Bubendorf, Switzerland cat.#: D-1295) 10 20mg, 用于将第一个氨基酸残基与树脂偶联的方案是由生产商提供的 4-二甲基氨基吡啶催化的预先制备的对称酐的偶联, 随后再用苯甲酸酐对树脂上的残留-OH 进行封端。

通过与由 10.8ml THF(四氢呋喃)、1.8ml 乙醇、211mg LiBr 和 92mg NaBH₄ 组成的混合物一起, 在室温下将所述肽树脂搅拌 24 小时, 把保护肽(2S)-((3-(1-Adoc-4-咪唑基)丙酰基)-D-Trp-Ala Ψ(CH₂NH)Trp-D-Phe-NH)-6-(Boc-氨基)-己醇从 1800mg 的 3-(1-Adoc-4-咪唑基)丙酰基-D-Trp-Ala Ψ(CH₂NH)Trp-D-Phe-Lys(Boc)-Sasrin 树脂上切下来。然后将 2ml H₂O 和 2ml 乙酸滴加进去。过滤除去树脂珠, 并用 25ml 的乙醇洗涤。通过抽真空浓缩上述滤液, 用 50ml H₂O 稀释残余的油状物并冷冻干燥。按例 1 所述方法用 TFA 对所得粉状物进行裂解。按照例 1 所述方法对所得粗制肽的 1/5 进行提纯, 产量为 28.54mg。

按照例 1 所述的方法对最终产物进行鉴定。采用洗脱条件 A1 时的保留时间为 20.4 分钟。

例 14

3-((3-(4-咪唑基)丙酰基)-D-Trp-Ala Ψ(CH₂NH)Trp-D-Phe-NH)丙胺

采用类似于例 1 所述的方法以 1mmol 的规模合成肽树脂(3-

(1-Adoc-4-咪唑基)丙酰基)-D-Trp-Ala Ψ (CH₂NH)Trp-D-Phe-Sasrin 树脂, 所不同的是, 采用的是取代能力为 0.87mmol/g 的 1000mg Sasrin 树脂 (2-甲氧基-4-烷氧苄基醇树脂)

(Bachem, Bubendorf, Switzerland cat.#: D - 1295), 而且, 用于将第一个氨基酸残基与树脂偶联的方案是由生产商提供的 4-二甲基氨基吡啶催化的预先制备的对称酐的偶联, 随后再用苯甲酸酐对树脂上的残留 - OH 基进行封端。

通过在室温下与 10ml 1, 3-二氨基丙烷一起搅拌 20 小时, 将肽 3-((3-(1-Adoc-4-咪唑基)丙酰基)-D-Trp-Ala Ψ (CH₂NH)Trp-D-Phe-NH)丙胺从 1000mg 的(3-(1-Adoc-4-咪唑基)丙酰基)-D-Trp-Ala Ψ (CH₂NH)Trp-D-Phe-Sasrin 树脂上切下来。滤去废树脂, 并用 5ml DMF 提取。在搅拌条件下, 将合并的滤液和提取液缓慢加入 240ml 1M 的氢氟酸中。然后用 H₂O 将混合物稀释至 500ml, 并过滤。

用与例 1 类似的方法, 在 9 个实验中将滤液直接加注到 9 × 1/9'th 的层析柱上, 通过半制备 HPLC 对粗制肽进行提纯。产量为 73.53mg。

按照例 1 所述方法对最终产物进行鉴定。

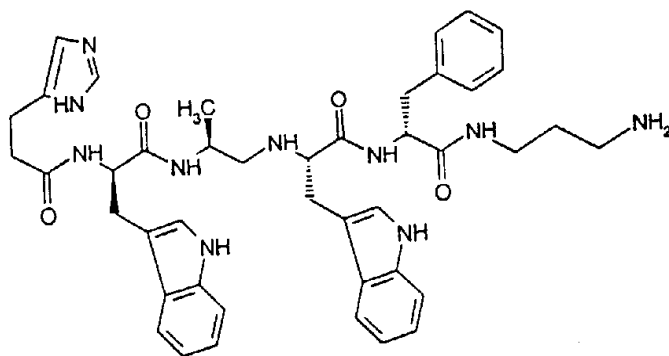
采用洗脱条件 A1 和 B1 时的保留时间分别为 21.5 分钟和 22.7 分钟。

例 15 - 18

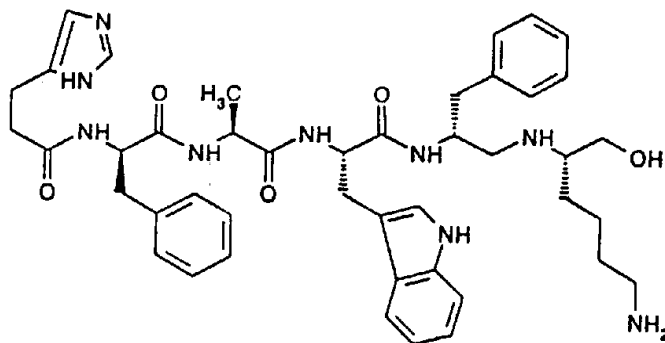
例	肽	用类似于以下实 施例的方法进行 制备	RP - HPLC 保留时 间	
			条件 A1 (例 1)	条件 B1 (例 1)
15	(2R)-(H-D-2Nal-Ala-N- Bzl-Gly-NH)-3-苯丙胺	6	29.6	31.2
16	(2R)-(H-D-Ala-D-2Nal- Ala-N-Bzl-Gly-NH)-3-苯 丙胺	6	29.4	31.1
17	H-D-Ala-D-2Nal-Ala-N- Bzl-Gly-D-Phe Ψ (CH ₂ NH)Lys-NH ₂	2	30.4	31.7
18	(2R)-(H-Aib-D-2Nal-Ala- N-Bzl-Gly-NH)-3-苯丙胺	6	28.1	29.2

本发明代表性化合物的结构如下:

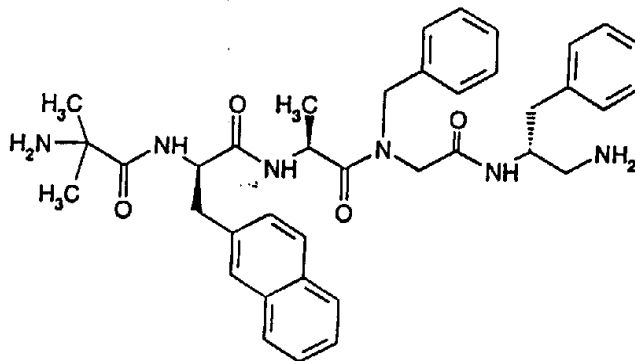
3-((3-(4-咪唑基)丙酰基)-D-Trp-Ala Ψ (CH₂NH)Trp-D-Phe-
NH)丙胺



(2S)-((2R)-((3-(4-咪唑基)丙酰基)-D-Phe-Ala-Trp-NH)-3-苯丙氨基)-6-氨基己醇



H-Aib-D-2Nal-Ala-N-Bzl-Gly-D-Phe Ψ (CH₂NH₂)



例 19

用大鼠垂体细胞建立一个体外分析，以研究不同的 GH 促分

泌素的作用。从雌性大鼠的垂体前叶中分离混合的垂体细胞培养物，并培养3天。洗涤之后，刺激细胞15分钟，并测定培养物上清液中所分泌的GH量。

大鼠垂体细胞的提取方法为 Sartor, O. 等人方法 (Endocrinology 116, 1985, pp. 952-957) 的改进方法。断头之后，从250mg的雌性 Sprague-Dawley 大鼠体内分离垂体。除去垂体中叶，将其余部分放入补充了0.25%葡萄糖、2×非必须氨基酸和1% BSA的 Gey's 培养基(提取缓冲液)中。将腺体切成小片并转移到盛3ml添加有11.5mg胰蛋白酶和1000 μg DNase的提取缓冲液的三角瓶中，并在37℃，以95% O₂和70rpm的转速培养35分钟。通过在提取缓冲液中沉淀将片段洗涤3次，并用巴氏吸管将其抽吸成单细胞。分散之后通过尼龙滤膜(160 μm)对细胞进行过滤，以除去未消化的组织。用补充了胰蛋白酶抑制剂(0.75mg/ml)提取缓冲液将细胞洗涤3次，并再悬浮于培养基(补充25mM HEPES、4mM 谷氨酰胺、0.75% NaHCO₃、2.5% FCS、3% 马血清、10% 大鼠血清、1nM T₃和40 μg/L 地塞米松的 DMEM)中，使密度为2×10⁵细胞/ml。将细胞接种到微量滴定板上，200 μl/眼，并在37℃，8% CO₂条件下培养3天。

在上述培养阶段之后，用激发缓冲液(补充了1% BSA、0.25% D-葡萄糖和25mM HEPES的 HBSS)洗涤细胞2次，并预培养1小时。然后除去缓冲液，并加入含有本发明化合物的新激发缓冲液，在37℃和5% CO₂条件下将上述滴定板温育15分钟。收集缓冲液，并在以下的闪烁亲近分析(SPA)中分析大鼠生长

激素 (rGH) 的含量 (SPA , 基本上如以下文献所公开的方法:
US4, 568, 649, Hart 和
Greenwalt, Mol. Immunol. 16, 1979, pp. 265-269, 或 Udenfriend 等,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 1985, pp. 8672-8676) .

rGH 分析是在适于在 Packards Topcount (β - 闪烁计数器)
上直接计数的 Opti Plates (96 眼板) 上进行.

分析方案:

40 μ l 缓冲液

10 μ l 样品 (培养的激发缓冲液)

50 μ l 125 I - rGH

50 μ l 兔抗 - rGH

50 μ l SPA 试剂 (与氟微球体结合的抗兔抗体)

将板密封, 并放在板摇床上摇动 30 分钟, 接着再培养 10 小
时, 在 10 - 15 $^{\circ}$ C 沉降并计数.

在该 SPA 中, 与抗 - GH 兔抗体 (初级抗体) 结合的 rGH 和
与氟微球体 (SPA Type II RIA, 购自 Amersham) 结合的次级
抗体反应. 任何放射性标记的与初级抗体结合的 rGH 都能固定在
该氟微球体上, 然后就能够发光. 在 β - 闪烁计数器上测量, 可
以计算出放射性标记的 rGH 量. 随着样品中 rGH 含量的增加,
与氟微球体结合的放射性标记的 rGH 量减少.

化合物	EC ₅₀ (nM)	E _{max} (% GHRP-6)
H-His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	2.0	100
H-D-Ala-D-2Nal-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	1.8	85
H-His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Ψ (CH ₂ NH)Lys-NH ₂	0.5	100
H-DAla-D2Nal-Gly-Trp-DPhe-Lys-NH ₂	0.8	75
(2S)-((3-(4-咪唑基)丙酰基)-D-Phe-Ala-Trp-D-Phe Ψ (CH ₂ NH)-6 - 氨基乙醇	5	80