

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

C07K 7/02

C07K 7/06

A61K 38/08 A61P 5/02

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 94194590.1

[45]授权公告日 2000年5月24日

[11]授权公告号 CN 1052731C

[22]申请日 1994.12.22 [24]颁证日 2000.2.19

[21]申请号 94194590.1

[30]优先权

[32]1993.12.23 [33]DK [31]1439/93

[32]1994.1.28 [33]DK [31]0121/94

[32]1994.10.14 [33]DK [31]1191/94

[86]国际申请 PCT/DK94/00485 1994.12.22

[87]国际公布 WO95/17423 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

B. 皮奇克

[56]参考文献

EP257742 1988. 3. 2

WO9304081 1993. 3. 4

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 闯

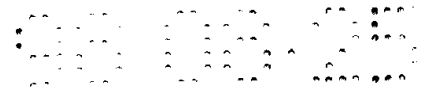
权利要求书 11 页 说明书 54 页 附图页数 0 页

[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)_p 的合成肽, 其中 p 为 0 或 1, 由于具有 相邻氨基酸, 并有选择的结合以用(Y-N-R₁₈), 如氨基亚甲基(-CH₂NH-) 取代酰胺键和/或改进该肽的 N- 或 C- 末端, 它具有改善了的对蛋白酶降解作用的抵抗力。该肽衍生物可以激发垂体释放生长激素。

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



权 利 要 求 书

1.一种通式 I 所述的化合物



其中

p 为 0 或 1;

A 为氢或 $R^1 - (CH_2)_q - (X)_r - (CH_2)_s - CO-$;

其中

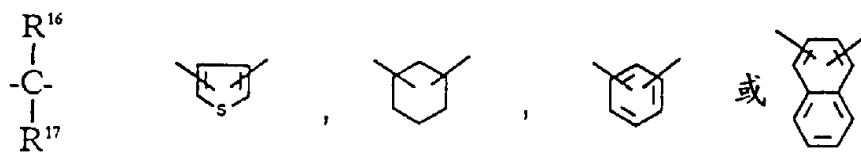
q 为 0 或 1 - 5 之间的一个整数;

r 为 0 或 1;

s 为 0 或 1 - 5 之间的一个整数;

R^1 为氢、咪唑基、胍基、哌嗪基、吗啉代、哌啶子基或 $N(R^2) - R^3$, 其中, R^2 和 R^3 各自独立地为氢或有选择地被一个或多个羟基、吡啶基或呋喃基取代过的低级烷基; 而

当 r 为 1 时, X 是 $-NH-$, $-CH_2-$, $-CH=CH-$,



其中, R^{16} 和 R^{17} 各自独立地为氢或低级烷基;

B 是 $(G)_t - (H)_u$, 其中

t 为或 0 或 1;

u 为或 0 或 1;

G 和 H 是从天然 L - 氨基酸或其相应的 D - 异构体或者非天然氨基酸中选择的氨基酸残基,

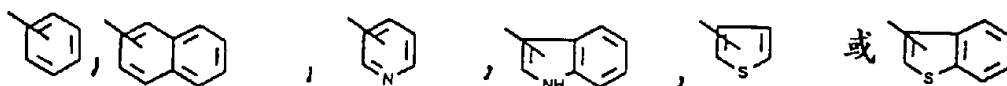
其中, 当 t 和 u 都为 1 时, G 和 H 之间的酰胺键可有选择地

被 $-Y-\overset{\text{R}^{18}}{\underset{|}{\text{N}}}$ 取代, 其中, Y 是 $\text{>C}=\text{O}$ 或 $\underset{|}{\text{C}}\text{H}_2$, 而 R^{18} 为氢、低级烷基或低级芳烷基;

C 为式 $-\text{NH}-\text{CH}((\text{CH}_2)_w-\text{R}^4)-\text{CO}-$ 的 D - 氨基酸, 其中

w 为 0、1 或 2; 而

R^4 选自下列基团



其中的每一个基团有选择地被卤基、低级烷基、低级烷氧基、低级烷氨基、氨基或羟基取代;

当 p 为 1 时, D 是式 $-\text{NH}-\text{CH}((\text{CH}_2)_k-\text{R}^5)-\text{CO}-$ 的 D - 氨基酸, 或当 p 为 0 时, D 是 $-\text{NH}-\text{CH}$

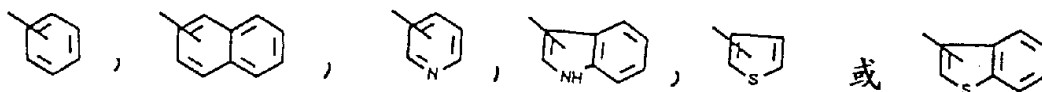
$((\text{CH}_2)_l-\text{R}^5)-\text{CH}_2-\text{R}^6$ 或 $-\text{NH}-\text{CH}((\text{CH}_2)_m-\text{R}^5)-\text{CO}-\text{R}^6$, 其中

k 为 0、1 或 2;

l 为 0、1 或 2;

m 为 0、1 或 2;

R^5 选自下列基团





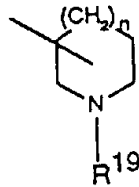
其中每个基团有选择地被卤基、烷基、烷氧基或羟基所取代；而

R^6 为哌嗪基、吗啉代、哌啶子基、 $-OH$ 或 $-N(R^7) - R^8$ ，其中 R^7 和 R^8 各自独立地为氢或低级烷基；

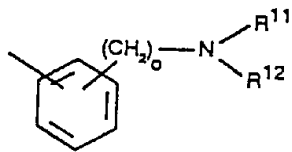
当 p 为 1 时， E 是 $-NH - CH(R^{10}) - (CH_2)_v - R^9$ ，其中

v 为 0 或 1 - 8 之间的一个整数；

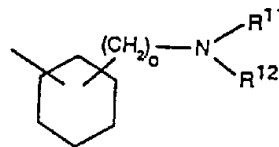
R^9 为氢、咪唑基、胍基、哌嗪基、吗啉代、哌啶子基，



其中 n 为 0、1 或 2，而 R^{19} 是氢或低级烷基，

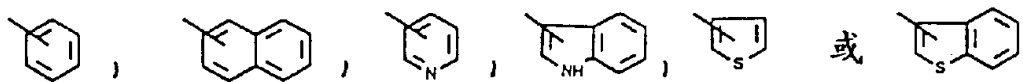


或



其中 o 为 1 - 3 之间的整数，

或 $N(R^{11}) - R^{12}$ ，其中 R^{11} 和 R^{12} 各自独立地为氢或低级烷基，或



每个基团有选择地被卤基、烷基、烷氧基、氨基、烷氨基、羟基、或氨基与吡喃己糖或吡喃己糖基吡喃己糖的 Amadori 重排



产物所取代

和

当 p 为 1 时, R^{10} 是选自 $-H$ 、 $-COOH$ 、 $-CH_2-R^{13}$ 、 $-CO-R^{13}$ 或 $-CH_2-OH$ 的基团, 其中

R^{13} 为哌嗪基、吗啉代、哌啶子基、 $-OH$ 或 $-N(R^{14})-R^{15}$, 其中 R^{14} 和 R^{15} 各自独立地为氢或低级烷基;

B 与 C 之间的酰胺键, 或者当 t 和 u 为 0 时 A 与 C 之间的酰胺键有选择地被

$-Y-\overset{R^{18}}{\underset{|}{N}}$ 取代, 其中 Y 为 $\overset{O}{\parallel}C$ 或 $\overset{|}{CH_2}$ 而 R^{18} 为氢、低级烷基或低级芳烷基,

或者, 当 p 为 1 时, D 与 E 之间的酰胺键有选择地被

$-Y-\overset{R^{18}}{\underset{|}{N}}$ 所取代, 其中 Y 和 R^{18} 如上所述;

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 为氢。

4. 如权利要求 1 所述的化合物, 其中 G 和 H 是 1, 4-二氨基丁酸、氨基异丁酸、1, 3-二氨基丙酸、4-氨基苯丙氨酸、3-吡啶丙氨酸、1, 2, 3, 4-四氢异喹啉-3-羧酸、1, 2, 3, 4-四氢norharman-3-羧酸、 N -甲基氨基苄酸、氨基苄酸、 N -苄基甘氨酸、3-氨基甲基苯甲酸、3-氨基-3-甲基丁酸、肌氨酸、3-哌啶甲酸或异哌啶甲酸。

5. 如权利要求 1 所述的化合物, 其特征在于 A 是 $R^1-(CH_2)$



$q - (X)_r - (CH_2)_s - CO$; 其中 R^1 为 3-咪唑基, q 为 2, r 为 0, s 为 0; 或者 R^1 为 NH_2 , q 为 1, r 为 1, X 是双取代的苯, 而 s 为 0; 或者 R^1 为 NH , q 为 1, r 为 1, X 是双取代的噻吩, 而 s 为 0.

6. 如权利要求 5 所述的化合物, 其中 R^1 为 NH_2 , q 为 1, r 为 1, X 为 1, 3-二取代的苯, 而 s 为 0; 或者其中 R^1 为 NH , q 为 1, r 为 1, X 为 2, 3-二取代的噻吩, 而 s 为 0.

7. 如权利要求 1 所述的化合物, 其特征在于当 t 为 1 时, G 是 Ala、Gly、Aib、肌氨酸、3-哌啶甲酸或异哌啶甲酸.

8. 如权利要求 1 所述的化合物, 其特征在于, 当 u 为 1 时, H 是 His、Phe、Tic、3Pyal、Gly、Ala、Phe(4- NH_2)、Sar、Pro、Tyr、Arg、Orn、3-氨基甲基苯甲酸或 D-Phe.

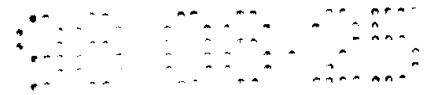
9. 如权利要求 1 所述的化合物, 其特征在于 R^4 是 2-萘基.

10. 如权利要求 1 所述的化合物, 其特征在于 R^5 是苯基.

11. 如权利要求 2 所述的化合物, 其特征在于 v 是 2-6, R^9 是 $-NH_2$ 、吗啉代丙基、吗啉代乙基或 (1-甲基吡咯烷基) 乙基.

12. 如权利要求 2 所述的化合物, 其特征在于 R^{10} 是 $-COOH$ 、 CH_2-OH 、 $-H$ 或 $CONH_2$.

13. 如权利要求 1 所述的化合物, 选自下列诸化合物:



H-Ala-His Ψ (CH₂NH)D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂
H-Ala-Ala-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂
H-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂
(3-(4-咪唑基)丙酰基) - D - 2Nal-D-Phe-Lys-NH₂
H-D-Lys-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂
H-5Apent-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂
H-D-Ala-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂
H-5Apent-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂
(正丙基)-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂
H-Ala-3Pyal-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂
H-Ala-Phe(4-NH₂)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂
H-D-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂
(2-(4-咪唑基)乙酰基)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂
(3-(4-咪唑基)丙烯酰)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂
(3-氨基苯甲酰)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂
(3-氨基苯乙酰)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂
(4-氨基苯乙酰)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂
(3-氨基丁烯酰)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂
(4-吡啶子基 - 羧基)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂
H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-NH₂
(H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-NH)己烷



6- (H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-NH)己胺
5 - (H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-NH)戊胺
H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe Ψ (CH₂NH)Lys-NH₂
H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-OH
(2S)-(H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-NH)-6-氨基己醇
(2-(H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-NH)乙基)苯
2-(H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-NH)乙胺
4-((H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-NH)甲基)苄胺
H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-Lys(麦芽糖基)-NH₂
H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-Phe-NH₂
H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-D-Phe-NH₂
H-Ala-His-D-Phe-D-Phe-Lys-NH₂
H-Ala-His-D-Trp-D-Phe-Lys-NH₂
H-His-D-2Nal-D-Trp-Lys-NH₂
H-Ala-His-D-1Nal-D-Phe-Lys-NH₂
H-Ala-Phe-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂
H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-Lys (麦芽糖基) -NH₂
(2R)-(H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH)-3 苯丙胺
H-Ala-N-Me-(2-氨基苯甲酰)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂
(3-(甲基氨基甲基)苯甲酰)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂
(4-(氨基甲基)苯甲酰) - D - 2Nal-D-Phe-Lys-NH₂
H-His-Ala-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂
4-(H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-NH)丁胺
3-(H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-NH)丙胺



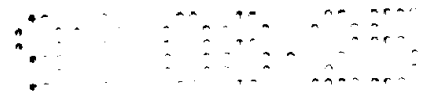
(3-(二甲基氨基甲基)苯甲酰)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂
(3-氨基-3-甲基丁酰基)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂
(3-氨基苯甲酰)-D-hPhe-D-Phe-Lys-NH₂
(3-氨基苯甲酰) Ψ (CH₂NH) D - 2Nal-D-Phe-Lys-NH₂
(3-氨基苯甲酰)-D-2Nal-D-hPhe-Lys-NH₂
(3-氨基-3-甲基丁酰基)-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂
(3-氨基苯甲酰)-D-2Nal-N-Bzl-Gly-Lys-NH₂
(2S)-(3-氨基苯甲酰) Ψ (CH₂NH)-D-2Nal-D-Phe-NH)-6-氨基

己醇

(2S)((3-氨基苯甲酰)-D-2Nal-D-Phe-NH)-6-氨基己醇
(3-氨基苯甲酰)-D-2Nal-D-Thial-Lys-NH₂
(2S)-(H-Aib-His Ψ (CH₂NH)-D-2Nal-D-Phe-NH)-6-氨基己醇
(3-氨基苯甲酰)-D-2Nal-D-3Pyal-Lys-NH₂
(3-氨基苯甲酰)-D-2Nal-D-Phe(4-F)-Lys-NH₂
(3-氨基苯甲酰)-D-2Nal-D-Phe(4-OMe)-Lys-NH₂
(2-氨基苯乙酰)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂
(2-氨基苯甲酰)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂
2-(H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-NH)-(4-吡啶基)乙烷
H-Aib-Phe-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂
2-(H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-NH)-(1-甲基-2-吡咯烷基)乙

烷

2-(H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-NH)-(4-吡啶基)乙烷
H-Aib-His Ψ (CH₂NH)-D-2Nal-D-Phe-Lys-OH
(3-氨基苯甲酰)-D-2Nal-N-Me-D-Phe-Lys-NH₂



H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-Gly-NH₂
H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-Ala-NH₂
H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-Orn-NH₂
(5-氨基咪唑吩基)-2-羧基)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂
H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-D-Lys-NH₂
H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-Dab-NH₂
H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe Ψ (CH₂NH)-Lys-NH₂
H-Aib-His-N-Me-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂
H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-N-Me-Lys-NH₂
(3-氨基咪唑吩基 - 2 - 羧基)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂
H-Aib-His-D-2Nal-N-Me-D-Phe-Lys-NH₂
H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-N(Me)₂
(3R) - 咪唑羧基-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂
(3S) - 咪唑羧基-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂
(3-氨基苯甲酰)-D-1Nal-D-Phe-Lys-NH₂
H-Aib-His-D-2Nal-D-Trp-Lys-NH₂
(糠基)-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂
(2-吡啶甲基)-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂
H-Aib-(3-氨基苯甲酰)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂
H-Aib-3Pyal-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂
(3S)-咪唑羧基-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂
(3R)-咪唑羧基-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂
(2-(H-Aib-His-D-2Nal-NH)乙基)苯
N,N-二(2R-羟丙基)-(3-氨基苯甲酰)-D-2Nal-D-Phe-Lys-



NH₂

(2R-羧丙基)-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂

(3-氯甲基苯甲酰)-D-2Nal-D-Phe Ψ (CH₂NH)Lys-NH₂

(3-氯甲基苯甲酰)-N-Me-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂

(3-氯甲基苯甲酰)-D-2Nal-D-Phe-N-Me-Lys-NH₂

H-D-Thr-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂

H-Aib-His-D-2Nal-N-(苄乙基)-Gly-Lys-NH₂

(3-氯甲基苯甲酰)-D-2Nal-N-(苄乙基)-Gly-Lys-NH₂

H-Hyp-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂

H-Aib-His-N-Me-D-2Nal-N-(苄乙基)-Gly-Lys-NH₂

H-Aib-His-N-Me-D-2Nal-N-Me-D-Phe-Lys-NH₂

H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe Ψ (CH₂N(Me))-Lys-NH₂

3-(H-Aib-His-D-2Nal-N-Me-D-Phe-NH)吗啉代丙烷

2-(H-Aib-His-D-2Nal-N-Me-D-Phe-NH)-(1-甲基-2-吡咯烷基)乙烷

(3R)-哌啶羧基-N-Me-D-2Nal-N-Me-D-Phe-Lys-NH₂

3-((氯甲基苯甲酰)-D-2Nal-N-Me-D-Phe-NH)吗啉代丙烷

2-(H-Aib-His-N-Me-D-2Nal-N-Me-D-Phe-NH)-(1-甲基-2-吡咯烷基)乙烷

2-(3R)-哌啶羧基-N-Me-D-2Nal-N-Me-D-Phe-NH)-(1-甲基-2-吡咯烷基)乙烷

2-(3-氯甲基苯甲酰)-N-Me-D-2Nal-N-Me-D-Phe-NH)-(1-甲基-2-吡咯烷基)乙烷

3-(H-Aib-His-N-Me-D-2Nal-N-Me-D-Phe-NH)吗啉代丙烷

3 - ((3R)-哌啶羧基 - N - Me-D-2Nal-N-Me-D-Phe-NH)吗啉代丙烷

3-((3-氨基苯甲酰)-N-Me-D-2Nal-N-Me-D-Phe-NH)吗啉代丙烷

H-Aib-His-D-2Nal-N-Me-D-Phe-Hyp-NH₂

2-((3-氨基苯甲酰)-D-2Nal-N-Me-D-Phe-NH)-(1-甲基 - 2 - 吡咯烷基)乙烷

2-((3R)哌啶羧基-D-2Nal-N-Me-D-Phe-NH)-(1-甲基 - 2 - 吡咯烷基)乙烷

H - Aib - His - D - 2Nal - D - Phe - Lys - NH₂

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

15.如权利要求 14 所述的单位剂量形式的组合物，含有约 10 - 约 200mg 的通式 I 的化合物或其可药用盐。

16.一种用于激发垂体释放生长激素的药用组合物，该组合物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。

17.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介导。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。

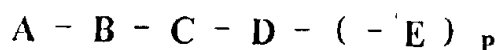
对需要提高生长激素的水平或症状来说，由于生长激素的蛋白质性质，使得除肠胃外使用的任何用法都没有活性。另

外，其它直接作用的天然促分泌素如 GHRH 和 PACAP 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 为氢或 $R^1 - (CH_2)_q - (X)_r - (CH_2)_s - CO$ ，其中

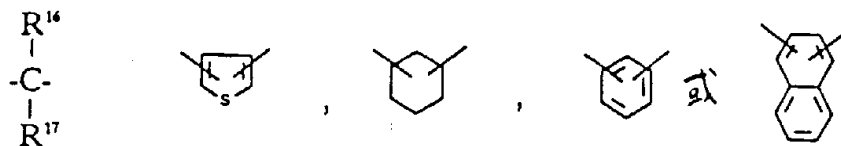
q 为 0 或 1 - 5 之间的一个整数；

r 为 0 或 1；

S 为 0 或 1 - 5 之间的一个整数；

R^1 为氢、咪唑基、胍基、哌嗪基、吗啉代或 $N(R^2) - R^3$ ，其中， R^2 和 R^3 各自独立地为氢或有选择地被一个或多个羟基、吡啶基或呋喃基取代过的低级烷基；而

当 r 为 1 时，X 是 $-NH-$ ， $-CH_2-$ ， $-CH=CH-$



其中, R^{16} 和 R^{17} 各自独立地为氢或低级烷基;

B 是 $(G)_t - (H)_u$, 其中

t 为 0 或 1;

u 为 0 或 1;

G 和 H 是从天然 L-氨基酸或其相应的 D-异构体或者非天然氨基酸中选择的氨基酸残基, 如 1, 4-二氨基丁酸、氨基异丁酸、1, 3-二氨基丙酸、4-氨基苯丙氨酸、3-吡啶丙氨酸、1, 2, 3, 4-四氢异喹啉-3-羧酸、1, 2, 3, 4-四氢 norharman-3-羧酸、N-甲基氨基茛菪酸、氨基茛菪酸、N-苄基甘氨酸、3-氨基-3-甲基苯甲酸、3-氨基-3-甲基丁酸、肌氨酸、3-哌啶甲酸或异哌啶甲酸;

其中, 当 t 和 u 都为 1 时, G 和 H 之间的酰胺键可有选择地

被 $-Y-\overset{R^{18}}{\underset{|}{N}}$ 取代, 其中, Y 是 >C=O 或 CH_2 , 而 R^{18} 为氢、低级烷基或低级芳烷基;

C 为式 $-\text{NH}-\text{CH}((\text{CH}_2)_w - R^d) - \text{CO}-$ 的 D-氨基酸, 其中

w 为 0、1 或 2, 而

R^d 选自下列基团



其中的每一个基团有选择地被卤基、低级烷基、低级烷氧基、低级烷氨基、氨基或羟基取代；

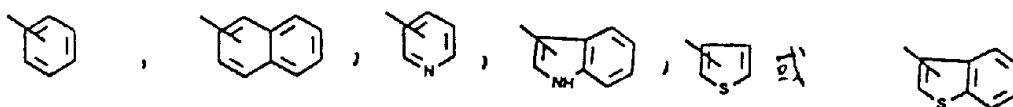
当 p 为 1 时， D 是式 $-\text{NH}-\text{CH}((\text{CH}_2)_k-\text{R}^5)-\text{CO}-$ 的 D -氨基酸，或当 p 为 0 时， D 是 $-\text{NH}-\text{CH}((\text{CH}_2)_l-\text{R}^5)-\text{CH}_2-\text{R}^6$ 或 $-\text{NH}-\text{CH}((\text{CH}_2)_m-\text{R}^5)-\text{CO}-\text{R}^6$ ，其中

k 为 0、1 或 2；

l 为 0、1 或 2；

m 为 0、1 或 2；

R^5 选自下列基团



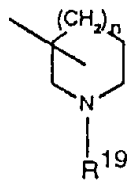
其中每个基团有选择地被卤基、烷基、烷氧氨基或羟基所取代；而

R^6 为哌嗪基、吗啉代、哌啶子基、 $-\text{OH}$ 或 $-\text{N}(\text{R}^7)-\text{R}^8$ ，其中 R^7 和 R^8 各自独立地为氢或低级烷基；

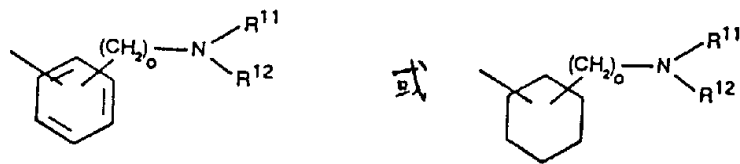
当 p 为 1 时， E 是 $-\text{NH}-\text{CH}(\text{R}^{10})-(\text{CH}_2)_r-\text{R}^9$ ，其中

r 为 0 或 1 - 8 之间的一个整数；

R^9 为氢、咪唑基、胍基、哌嗪基、吗啉代、哌啶子基，

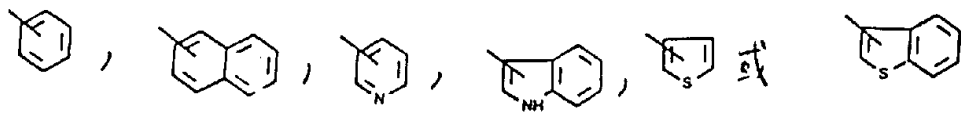


其中 n 为 0、1 或 2，而 R^{19} 是氢或低级烷基，



其中 o 为 1 - 3 之间的整数，

或 $N(R^{11}) - R^{12}$ ，其中 R^{11} 和 R^{12} 各自独立地为氢或低级烷基，或



每个基团有选择地被卤基、烷基、烷氧基、氨基、烷氨基、羟基、或氨基与吡喃己糖或吡喃己糖基吡喃己糖的 Amadori 重排产物所取代

和

当 p 为 1 时， R^{10} 是选自 $-H$ 、 $-COOH$ 、 $-CH_2 - R^{13}$ 、 $-CO - R^{13}$ 或 $-CH_2 - OH$ 的基团，其中

R^{13} 为哌嗪基、吗啉代、哌啶子基、 $-OH$ 或 $-N(R^{14}) -$

R^{15} , 其中 R^{14} 和 R^{15} 各自独立地为氢或低级烷基;

B 与 C 之间的酰胺键, 或者当 t 和 u 为 0 时 A 与 C 之间的酰胺键有选择地被

$-Y-\overset{R^{18}}{\underset{|}{N}}-$, 其中 Y 为 $\text{>C}=\text{O}$ 或 CH_2 而 R^{18} 为氢、低级烷基或低级芳烷基取代,

或者, 当 p 为 1 时, D 与 E 之间的酰胺键有选择地被 $-Y-$

$\overset{R^{18}}{\underset{|}{N}}-$ 所取代, 其中 Y 和 R^{18} 如上所述;

或其可以药用的盐。

据认为, 式 I 的肽衍生物具有改善了的对由酶引起的蛋白酶解降解作用的抗性, 由于该肽序列中相邻 D-氨基酸的存在, 并

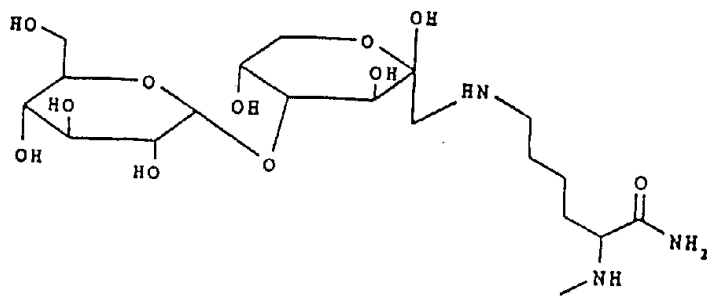
有选择地结合上述的用 $-Y-\overset{R^{18}}{\underset{|}{N}}-$ 取代酰胺键 ($-\text{CO}-\text{NH}-$), 例如氨基亚甲基 ($-\text{CO}_2-\text{NH}-$) 和/或对该肽的 N-或 C-末端进行改性。对蛋白酶解降解作用抵抗能力的提高, 并结合本发明肽衍生物大小的下降, 可望改善其相对现有文献中提出的肽的生物利用率。

在本文中, “低级烷基”一词表示具有 1-6 个碳原子的烷基, 具体有甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、戊基或己基。“卤基”一词包括 Cl、F、Br 和 I。在术语“低级烷氧基”、“低级芳烷基”和“低级烷氨基”中, 低级烷基部分具有上述含义。

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 是氢或 $R^1-(\text{CH}_2)_q-(\text{X})_r$

- (CH₂)_s - CO -, 其中 R¹ 是 3 - 咪唑基, q 为 2, r 为 0, s 为 0; 或者, 其中 R¹ 是 NH₂, q 为 1, r 为 1, X 是二取代的苯, 最好是在 1 和 3 位取代的苯, 而且 s 为 0; 或者, 其中 R¹ 是 NH₂, q 为 1, r 为 1, X 是二取代的噻吩, 最好是在 3 和 2 位上取代的噻吩, 而且 s 为 0. 当 t 为 1 时, 式 I 化合物中的 G 最好是 Ala、Gly、Aib、肌氨酸、3 - 咪唑甲酸或异咪唑甲酸. 当 u 为 1 时, H 最好是 His、Phe、Tic、Phe(4-NH₂)、3 - Pyl、Gly、Ala、Sar、Pro、Tyr、Arg、Orn、3 - 氯甲基苯甲酸或 D - Phe. 式 I 化合物中的 C 最好是 D - 2 - 萘丙氨酸 (D - 2Nal)、D - 1 - 萘丙氨酸 (D - 1Nal)、D - Phe 或 D - Trp. 式 I 化合物中的 D 最好是 D - Phe、D - 1Nal、D - 2Nal、D - Trp、3-Pyl、D - Phe(4F)、D - Tyr 或 Phe-NH₂.

式 I 化合物中的 E 最好是 Lys-NH₂、NH - (2 - (1 - 咪唑基) 乙基)、NH - (2 - (1 - 咪唑代) 丙基)、NH - (2 - 氯乙基)、NH - (4 - 氯甲基苄基)、NH - (苄基)、Lys-OH、NH - (1 - 羟基 - 6 - 氨基 - 2S - 己基)、NH - (2 - (1 - 甲基 - 2 - 吡咯烷基) 乙基), 或



式 I 化合物中的 R⁴ 最好是 2 - 萘基。R⁵ 最好是苯基。v 最好是 2 - 6，而 R⁹ 是 NH₂、吗啉代乙基、吗啉代丙基或 (1 - 甲基吡咯烷基) 乙基。R¹⁰ 最好是 - COOH、- CH₂ - OH、- H、CONH₂ 或 - CON (CH₃)₂。

本发明具体化合物的例子有：

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

H-Ala-Ala-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂

H-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂

(3-(4-咪唑基)丙酰基) - D - 2Nal-D-Phe-Lys-NH₂

H-D-Lys-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂

H-5Apent-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂

H-D-Ala-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂

H-5Apent-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂

(正丙基)-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂

H-Ala-3Pyal-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂

H-Ala-Phe(4-NH₂)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂

H-D-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂

(2-(4-咪唑基)乙酰基)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂

(3-(4-咪唑基)丙烯酰)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂

(3-氨基苯甲酰)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂

(3-氨基苯乙酰)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂

(4-氨基苯乙酰)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂

(3-氨基丁烯酰)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂

(4-吡啶子基 - 羧基)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂
 H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-NH₂
 (H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-NH)己烷
 6- (H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-NH)己胺
 5 - (H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-NH)戊胺
 H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe Ψ (CH₂NH)Lys-NH₂
 H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-OH
 (2S)-(H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-NH)-6-氨基己醇
 (2-(H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-NH)乙基)苯
 2-(H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-NH)乙胺
 4-((H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-NH)甲基)苄胺
 H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-Lys(麦芽糖基)-NH₂
 H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-Phe-NH₂
 H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-D-Phe-NH₂
 H-Ala-His-D-Phe-D-Phe-Lys-NH₂
 H-Ala-His-D-Trp-D-Phe-Lys-NH₂
 H-His-D-2Nal-D-Trp-Lys-NH₂
 H-Ala-His-D-1Nal-D-Phe-Lys-NH₂
 H-Ala-Phe-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂
 H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-Lys (麦芽糖基) -NH₂
 (2R)-(H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH)-3 苯丙胺
 H-Ala-N-Me-(2-氨基苯甲酰)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂
 (3-(甲基氨基甲基)苯甲酰)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂
 (4-(氨基甲基)苯甲酰) - D - 2Nal-D-Phe-Lys-NH₂

H-His-Ala-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂

4-(H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-NH)丁胺

3-(H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-NH)丙胺

(3-(二甲基氨基甲基)苯甲酰)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂

(3-氨基-3-甲基丁酰基)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂

(3-氨基苯甲酰)-D-hPhe-D-Phe-Lys-NH₂

(3-氨基苯甲酰) Ψ (CH₂NH) D - 2Nal-D-Phe-Lys-NH₂

(3-氨基苯甲酰)-D-2Nal-D-hPhe-Lys-NH₂

(3-氨基-3-甲基丁酰基)-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂

(3-氨基苯甲酰)-D-2Nal-N-Bzl-Gly-Lys-NH₂

(2S)-(3-氨基苯甲酰) Ψ (CH₂NH)-D-2Nal-D-Phe-NH)-6-氨基

己醇

(2S)((3-氨基苯甲酰)-D-2Nal-D-Phe-NH)-6-氨基己醇

(3-氨基苯甲酰)-D-2Nal-D-Thial-Lys-NH₂

(2S)-(H-Aib-His Ψ (CH₂NH)-D-2Nal-D-Phe-NH)-6-氨基己醇

(3-氨基苯甲酰)-D-2Nal-D-3Pyal-Lys-NH₂

(3-氨基苯甲酰)-D-2Nal-D-Phe(4-F)-Lys-NH₂

(3-氨基苯甲酰)-D-2Nal-D-Phe(4-OMe)-Lys-NH₂

(2-氨基苯乙酰)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂

(2-氨基苯甲酰)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂

2-(H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-NH)-(4-吡啶基)乙烷

H-Aib-Phe-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂

2-(H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-NH)-(1-甲基-2-吡咯烷基)乙

烷

2-(H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-NH)-(4-吡啶基)乙烷
 H-Aib-His Ψ (CH₂NH)-D-2Nal-D-Phe-Lys-OH
 (3-氯甲基苯甲酰)-D-2Nal-N-Me-D-Phe-Lys-NH₂
 H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-Gly-NH₂
 H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-Ala-NH₂
 H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-Orn-NH₂
 (5-氯甲基噻吩基)-2-羧基)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂
 H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-D-Lys-NH₂
 H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-Dab-NH₂
 H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe Ψ (CH₂NH)-Lys-NH₂
 H-Aib-His-N-Me-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂
 H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-N-Me-Lys-NH₂
 (3-氯甲基噻吩基 - 2 - 羧基)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂
 H-Aib-His-D-2Nal-N-Me-D-Phe-Lys-NH₂
 H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-N(Me)₂
 (3R) - 哌啶羧基-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂
 (3S) - 哌啶羧基-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂
 (3-氯甲基苯甲酰)-D-1Nal-D-Phe-Lys-NH₂
 H-Aib-His-D-2Nal-D-Trp-Lys-NH₂
 (糠基)-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂
 (2-吡啶甲基)-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂
 H-Aib-(3-氯甲基苯甲酰)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂
 H-Aib-3Pyal-ρ-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂
 (3S)-哌啶羧基-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂

(3R)-哌啶羧基-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂
 (2-(H-Aib-His-D-2Nal-NH)乙基)苯
 N,N-二(2R-羟丙基)-(3-氯甲基苯甲酰)-D-2Nal-D-Phe-Lys-
 NH₂
 (2R-羟丙基)-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂
 (3-氯甲基苯甲酰)-D-2Nal-D-Phe Ψ (CH₂NH)Lys-NH₂
 (3-氯甲基苯甲酰)-N-Me-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂
 (3-氯甲基苯甲酰)-D-2Nal-D-Phe-N-Me-Lys-NH₂
 H-D-Thr-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂
 H-Aib-His-D-2Nal-N-(苯乙基)-Gly-Lys-NH₂
 (3-氯甲基苯甲酰)-D-2Nal-N-(苯乙基)-Gly-Lys-NH₂
 H-Hyp-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂
 H-Aib-His-N-Me-D-2Nal-N-(苯乙基)-Gly-Lys-NH₂
 H-Aib-His-N-Me-D-2Nal-N-Me-D-Phe-Lys-NH₂
 H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe Ψ (CH₂N(Me))-Lys-NH₂
 3-(H-Aib-His-D-2Nal-N-Me-D-Phe-NH)吗啉代丙烷
 2-(H-Aib-His-D-2Nal-N-Me-D-Phe-NH)-(1-甲基-2-吡
 咯烷基)乙烷
 (3R)-哌啶羧基-N-Me-D-2Nal-N-Me-D-Phe-Lys-NH₂
 3-((氯甲基苯甲酰)-D-2Nal-N-Me-D-Phe-NH)吗啉代丙烷
 2-(H-Aib-His-N-Me-D-2Nal-N-Me-D-Phe-NH)-(1-甲基-
 2-吡咯烷基)乙烷
 2-(3R)-哌啶羧基-N-Me-D-2Nal-N-Me-D-Phe-NH)-(1-甲基-
 2-吡咯烷基)乙烷

2-(3-氯甲基苯甲酰)-N-Me-D-2Nal-N-Me-D-Phe-NH)-(1-甲基
- 2 - 吡咯烷基)乙烷

3-(H-Aib-His-N-Me-D-2Nal-N-Me-D-Phe-NH)吗啉代丙烷

3 - ((3R)-哌啶羧基 - N - Me-D-2Nal-N-Me-D-Phe-NH)吗啉
代丙烷

3-((3-氯甲基苯甲酰)-N-Me-D-2Nal-N-Me-D-Phe-NH)吗啉代
丙烷

H-Aib-His-D-2Nal-N-Me-D-Phe-Hyp-NH₂

2-((3-氯甲基苯甲酰)-D-2Nal-N-Me-D-Phe-NH)-(1-甲基 - 2 -
吡咯烷基)乙烷

2-((3R)哌啶羧基-D-2Nal-N-Me-D-Phe-NH)-(1-甲基 - 2 - 吡
咯烷基)乙烷

缩略语: D - 2Nal = D - 2 萘丙氨酸

5Apent = 5 - 氨基戊酸

3Pyal = 3 - 吡啶基丙氨酸

Aib = H - 氨基异丁酸

Thial = 噻吩基丙氨酸

hPhe = 高苯丙氨酸

N - Bzl-Gly = N - 苄基甘氨酸

4 - F = 4 - 氟

4 - OMe = 4 - 甲氧基

Orn = 鸟氨酸

Dab = 2, 4 - 二氨基丁酸

Hyp = 羟脯氨酸

Tic = 1, 2, 3, 4 - 四氢异喹啉 - 3 - 羧酸

可用常规的液相或固相肽合成法制备式 I 的化合物。例如，固相合成可基本上按 Steward 和 Young 所公开的方法（Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd Ed. Rockford, Illinois, USA, 1976）进行。液相合成则可大致按 Bodansky 等所公开的方法（Peptide Synthesis, 2nd Ed., New York, USA, 1976）进行。

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。可通过 Amadori 重排法制备含有由一或二-吡喃己糖衍生的氨基的肽衍生物，该方法基本上是 R. Albert 等所公开的方法（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、乳糖和纤维二糖。用作上述合成的原料的衍生物可通过商业渠道获得，而且，必要时提供适当的保护基，或者，也可以通过已知方法制备用于制备通式 I 的“A”部分的原料，并用已知方法有选择地加以保护。

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对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。预计式 I 的化合物可用于激发垂体释放生长激素的目的，而且还将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功能不全，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 0.0001mg - 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 % NaHCO₃、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。

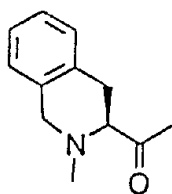
可按照以前公开的方法 (Bercu 等, *Endocrinology* 1991,129,2592-2598), 通过其对戊巴比妥麻醉的雌性大鼠生长激素释放的体内影响评价式 I 化合物在体内的作用。简而言之, 以 50mg/kg 戊巴比妥的剂量 ip 麻醉成年雌性 Sprague-Dawley 大鼠, 待大鼠完全麻醉之后, 将气管插管和导管植入其颈动脉和颈静脉中, 经过 15 分钟的恢复之后, 在 0 计时提取血样, iv 使用垂体促分泌素, 并将动脉血样在冰上放置 15 分钟, 然后以 $12,000 \times g$ 离心 2 分钟, 倒出血清并用标准 RIA 测定生长激素的含量。

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。

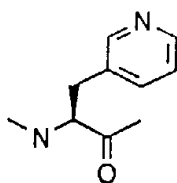
在本说明书中和实施例中所采用的缩略语是指以下结构:

用于非天然氨基酸残基的缩略语:

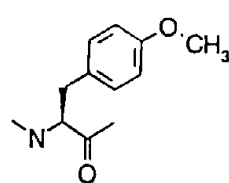
Tic



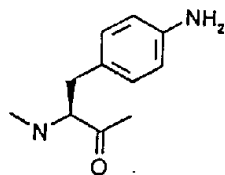
3Pyl



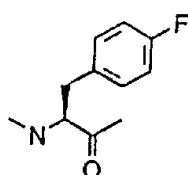
Phe(4OMe)



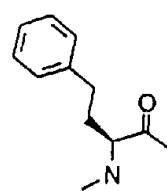
Phe(4-NH₂)



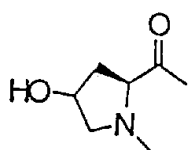
Phe(4-F)



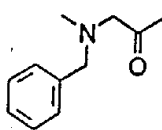
hPhe



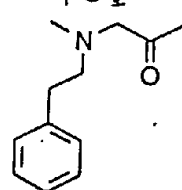
Hyp



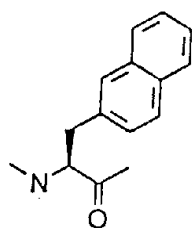
N-Bzl-Gly



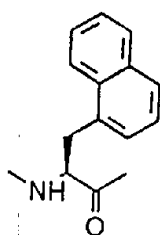
N-(苯乙基)-Gly



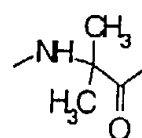
2Nal

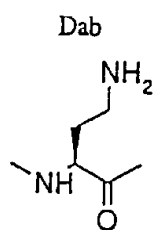
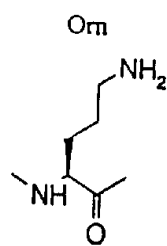
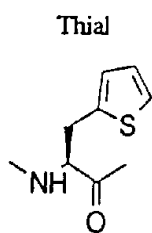
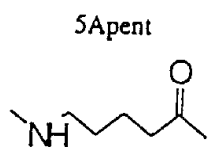


1Nal

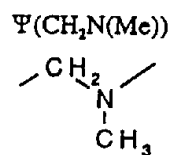
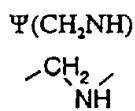
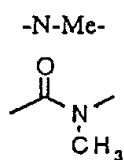


Aib

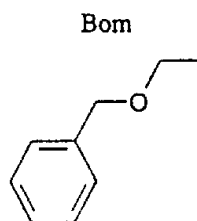
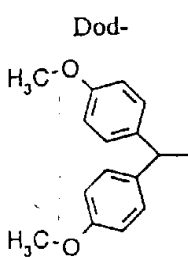
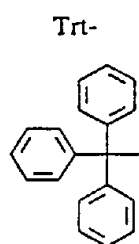
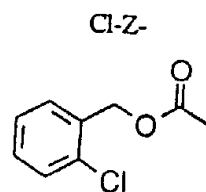
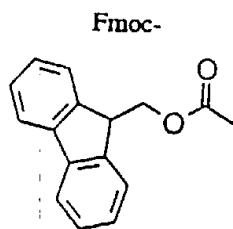
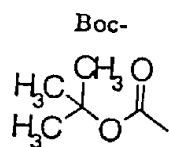




用于肽键取代基的缩略语:



用于保护基的缩略语:



在以下实施例中制备的化合物都是作为三氟乙酸 (TFA)

的盐分离的。

例 1

H-Ala-His-D-2Nal-D-Trp-Lys-NH₂

按照 Fmoc 方法，采用生产商提供的 FastMoc UV 方案以 0.22mmol 的规模在 Applied Biosystems 431A 肽合成仪上合成标题中的肽，使用的是在 NMP (N-甲基吡咯烷酮) 中由 HBTU (2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲六氟磷酸) 介导的偶联，并用 UV 监测 Fmoc 保护基的去保护。用于该合成的原始树脂是取代能力为 0.39mmol/g 的 559mg 4-(2',4'-二甲氧基苯基)-(Fmoc-氨基)甲基-苯氧基树脂 (Novabio-Chem, Bad Soden, Germany, Cat.#01-64-0013)。所使用的保护氨基酸衍生物是 Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-D-Trp-OH、Fmoc-2Nal-OH、Fmoc-His(Trt) 和 Fmoc-Ala-OH。

通过在室温下与由 4ml TFA (三氟乙酸)、300mg 苯酚、100 μl 乙二硫醇、200 μl 苯硫基甲烷和 200 μl H₂O 组成的混合物一起搅拌 180 分钟，将肽从 434mg 的肽树脂上切下来。过滤裂解混合物，并用氮气流将滤液浓缩至 1ml。用 45ml 乙醚将粗制肽从该油状物中沉淀，并用 50ml 乙醚洗涤 3 次。

干燥粗制的肽，并通过在装有 7 μc - 18SiO₂ 的 20mm × 250mm 层析柱上进行半制备 HPLC 提纯。该柱用溶于 0.05M (NH₄)₂SO₄ 的、并用 4MH₂SO₄ 调至 pH2.5 的 15% CH₃CN 预平衡过。将粗制肽溶于 2ml 溶解在 H₂O 中的 70% CN₃CN/0.1% TFA 中，并用水稀释至 100ml。将该溶液分成相等的两个部分，将每一部分在两个独立的实验中加注到层析柱上。在 40℃，在 47

分钟内以 10ml/分的速度，用溶于 0.05M (NH₄)₂SO₄ 中的 15 - 25 % CH₃CN (pH2.5) 梯度溶液洗脱。收集含肽部分，用 3 倍体积的水稀释并上用 0.1 % TFA 平衡过的 Sep-Pak[®]C₁₈ 柱 (Waters part.#:51910)。然后用含有 0.1 % TFA 的 70 % CH₃CN 将肽从 Sep-Pak[®]柱上洗脱，用水稀释后通过冷冻干燥法将肽从洗脱物中分离出来。产量为 19.0mg。

通过分析 RP - HPLC (保留时间) 和等离子体解吸质谱 (分子量) 鉴定所得到的最终产物。质谱结果在该方法允许的误差范围内 (质谱 ± 0.9amu) 与预期的结构符合。

采用 214nm 的 UV 检测并用一个 Vydac 218TP54 4.6mm × 250 mm 5 μ C - 18SiO₂ 柱 (The Separation Group, Hesperia) 进行 RP - HPLC 分析，在 42 °C 以 1ml/分的速度洗脱。采用两种不同的洗脱条件。

A1: 用溶于由 0.1M(NH₄)₂ SO₄ 组成的缓冲液中、并用 4MH₂SO₄ 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 梯度液洗脱。

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

采用洗脱条件 A1 和 B1 的保留时间分别为 17.88 分钟和 20.15 分钟。

例 2

H - Ala-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-OH

采用与例 1 类似的方法合成标题中的肽，所不同的是，将取

代能力为 0.49mmol/g 的 450mg Fmoc - Lys (Boc) - Wang 树脂 (Novabiochem.Bad Soden,Germany . cat.#:04 - 12 - 2014) 用作原料树脂。当采用例 1 所述方法将 560mg 肽树脂裂解并对所得到的 1/2 的粗制肽进行提纯时, 获得了 25.9mg 的产量。

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 的保留时间分别为 18.30 分钟和 20.15 分钟。

例 3

5- (H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-NH) 氨基戊烷

采用与例 1 类似的方法合成肽树脂 H - Ala-His(Trt)-D-2Nal-D-Phe-Sasrin 树脂, 所不同的是, 采用的是取代能力为 0.96mmol/g 的 262mg Sasrin 树脂 (2 - 甲氨基 - 4 - 烷氧苄基醇树脂) (Bachem,Bubendorf,Switzerland,cat.#:D-1295), 而将一个氨基酸残基偶联到该树脂上的方案是由 4 - 二甲氨基吡啶催化的预先制备的对称酐的偶联, 随后用苯甲酸酐对树脂上的残余 - OH 基进行封端。

通过在室温下与 0.5ml 1, 5 - 二氨基戊烷一起搅拌 20 小时, 将被部分保护的肽 5 - (H-Ala-His(Trt)-D-2Nal-D-Phe-NH) 氨基戊烷从 56mg 的 H-Ala-His(Trt)-D-2Nal-D-Phe-Sasrin 树脂上裂解下来。滤去废树脂, 并用 1ml DMF 提取。在搅拌条件下将合并的滤液和提取物缓慢加入由 2.5mlCH₃CN 和 10ml 1M 氢氯酸组成的混合物中, 在用 25 % CH₃CN 稀释至 50ml 后, 将混合物在 4 °C 下放置 100 小时 (用于裂解组氨酸上的三苯甲基保护) 。然后用水将该混合物稀释至 200ml 并过滤。

用与例 1 类似的方法将 1/2 的滤液直接加注到层析柱上, 通过

半制备 HPLC 将粗制肽提纯。所得产量为 4.5mg。

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 18.43 分钟和 20.75 分钟。

例 4

(2S) - (H - Ala-His-D-2Nal-D-Phe-NH) - 6 - 氨基乙醇

用与例 3 类似的方法，由取代能力为 0.96mmol/g 的 Sasrin 树脂合成肽树脂 H - Ala-His(Trt)-D-2Nal-D-Phe-Lys(Boc)-Sasrin 树脂。

通过在室温下与由 1.2ml THF (四氢呋喃)、0.2ml 乙醇、23mg LiBr 和 10mg NaBH₄ 组成的混合物一起将肽树脂搅拌 20 小时，将被部分保护起来的肽 (2S) - (H - Ala-His(Trt)-D-2Nal-D-Phe-NH) - 6 - 氨基乙醇从 200mg 的 H - Ala-His(Trt) - D-2Nal-D-Phe-Lys(Boc)-Sasrin 树脂上裂解下来。然后加入 200 μl H₂O、200 μl 乙酸和 4ml 乙醇。过滤除去树脂珠，用 50ml H₂O 稀释滤液并冷冻干燥。将所得到的粉状物进行 TFA 裂解并按例 1 方法提纯。为了获得足够纯的产品，必须重复提纯，获得 5.8mg 的产量。

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 的保留时间分别为 17.82 分钟和 20.02 分钟。

例 5

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

采用与例 1 类似的方法，以取代能力为 0.34mmol/g 的 556mg 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) 为原料合成肽树脂 H-D-2Nal-D-Phe-Lys-(Boc)Resin . 采用以下的保护氨基酸衍生物: Fmoc-Lys-(Boc)-OH、 Fmoc-D-Phe-OH 和 Fmoc-2Nal-OH .

按照 Sasaki,Y.和 Coy,D.H.的方法 (Peptides 8(1), 119 - 121 , 1987) 引入-CH₂NH-肽键等排物.

按照 Fehrentz,J.-A.和 Castro.B.的方法 (Synthesis 676-678,1983) , 由 820mg 相应的 N , O - 异羟肟酸二甲酯制备 Fmoc-His(Trt)-醛. 将粗制的醛溶于 8ml DMF 中并分成两份. 在室温下将第一部分加入溶于 DMF 中 10ml 1 % 乙酸中的 610mg H-D-2Nal-D-Phe-Lys-Resin 的搅拌浆体中. 然后加入溶于 1ml DMF 中的 57mg NaCNBH₃ (纯度 85 %) , 并继续搅拌 60 分钟. 此后, 过滤分离肽树脂, 并用溶于 DMF 中的 1 % 乙酸洗涤. 将肽树脂重新悬浮于 10ml 溶于 DMF 中的 1 % 乙酸中, 并加入另一部分 Fmoc-His(Trt)-醛. 在室温下再次加入溶于 1ml DMF 中的 57mg NaCNBH₃(纯度 85 %), 并搅拌混合物 18 小时.

在该还原性烷基化步骤之后, 过滤分离肽树脂并用溶于 DMF 的 1 % 乙酸洗涤, 按照上述方法, 用保护的氨基酸衍生物 Fmoc-Ala-OH、采用肽合成仪完成链延长.

将肽从 550mg 的肽树脂上裂解下来, 并用与例 1 类似的方法通过半制备 HPLC 提纯粗制肽. 获得 11.3mg 的产量.

按照例 1 所述方法鉴定最终产物. 采用洗脱条件 A1 和 B1 的保留时间分别为 13.35 分钟和 17.38 分钟.

例 6

(正丙基) - His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂ 和 (正丙基)₂ - His-D-2-Nal-D-Phe-Lys-NH₂

用与例 1 类似的方法, 以取代能力为 0.34mmol/g 的 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) 为原料合成肽树脂 H - His(Trt)-D-2Nal-D-Phe-Lys(Boc)-Resin. 所用保护的氨基酸衍生物是 Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-D-Phe-OH、Fmoc-2Nal-OH 和 Fmoc-His(Trt)-OH.

在室温下, 将 13 μ l 正丙醇加入溶于 3.3ml 由 DMF 配制的 1% 乙酸中的 150mg 的 H - His(Trt)-D-2Nal-D-Phe-Lys-Resin 的搅拌浆体中. 然后加入 16.8mg 溶于 0.5ml DMF 中的 NaCNBH₃ (纯度 85%), 并继续搅拌 6 小时. 在该还原性烷基化步骤之后, 分离肽树脂, 用 DMF 和 CH₂Cl₂ 在过滤漏斗上洗涤并真空干燥.

将所得到的两种肽树脂混合, 并将未烷基化的一正丙基和二正丙基肽从所得到的 300mg 肽树脂上裂解下来. 用与例 1 类似的方法通过半制备 HPLC 分离并提纯肽. 得到 6.54mg 正丙基 - His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂ 和 5.59mg (正丙基)₂ - His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂.

按照例 1 所述方法对最终产物进行鉴定. 对 (正丙基) - His - D - 2Nal-D-Phe-Lys-NH₂ 而言, 采用洗脱条件 A1 和 B1 的保留时间分别为 16.45 分钟和 19.92 分钟.

例 7

H - Ala - Tic-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂

用生产商提供的 0.5mmol 规模的单偶联方案, 以取代能力为

0.72mmol/g 的 620mg 4 - 甲基 BHA 树脂 (Bissenderf Biochemicals, Hannover, Germany, cat.#:RMIS50) 为原料, 按照 Boc 方法在 Applied Biosystems 430A 肽合成仪上合成标题中的肽, 采用的是在 DMF 中与预先制备的对称酐的单偶联。该方案调整到 60 分钟联偶时间。将 2×60 分钟的双偶联时间用于 N - 末端 Ala。用于该合成的保护的氨基酸衍生物是 Boc-Lys(2-氯 - Z) - OH、Boc-D-Phe-OH, Boc-D-2Nal-OH, Boc-Tic-OH 和 Boc-Ala-OH。

通过在 0℃ 与由 4.5ml HF 和 500 μ l m-甲酚组成的混合物一起搅拌 75 分钟, 将肽从 486mg 肽树脂上裂解下来。在 0℃ 用氮气流将 HF 蒸发掉。用 50ml 乙醚将肽从残余的油状物和废树脂中沉淀出来, 并用 50ml 乙醚洗涤 2 次。干燥之后, 用加有 4 滴乙酸的 10ml H₂O 将肽提取沉淀。用水将提取物稀释至 100ml。

用与例 1 类似的方法, 通过两套半制备 HPLC 从 2×18 ml 的稀释提取液中提纯粗制肽。产量为 17.3mg。

按照例 1 所述方法鉴定最终产物。

采用条件 A1 和 B1 进行 RP - HPLC 分析所得到的保留时间分别为 27.37 分钟和 29.50 分钟。

例 8

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

通过用溶于 NMP 中的 20% 吡啶处理 20 分钟, 除去 580mg 取代能力为 0.43mmol/g 的 4 - ((2',4'-二甲氧苯基) - (Fmoc-氨基) 甲基) - 苯氧基 (Novabiochem AG Switzerland cat.#:01-64-0013) 上的 Fmoc 基团。用 DMF 和 CH₂Cl₂ 洗涤树脂, 并用例

5 所述的烷基化方法用 Fmoc-D-Phe-醛进行烷基化。

此后，过滤分离肽树脂，在过滤斗漏上用溶于 DMF 中的 1 % 乙酸洗涤，并采用例 1 中的肽合成仪完成链延长。所用保护的氨基酸衍生物是 Fmoc-D-2Nal-OH、Fmoc-His(Trt)-OH 和 Fmoc-Ala-OH。

用与例 1 类似的方法将肽从肽树脂上裂解下来并通过半制备 HPLC 提纯粗制肽。产量为 23.92mg。

按照例 1 所述方法鉴定最终产物。采用洗脱条件 A1 和 B1 的保留时间分别为 19.33 分钟和 21.77 分钟。

例 9 - 54

| 例 | 肽 | 用类似于以下 实施例的方法 进行制备 | 条件 A1 的 RP - HPLC 保留时间 | 条件 B1 的 RP - HPLC 保 留时间 |
|----|--|--------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| 9 | H-Ala-His-D-Phe- D-Phe-Lys-NH ₂ | 1 | 12.53 | 15.43 |
| 10 | H-Ala-Phe-D- 2Nal-D-Phe-Lys- NH ₂ | 1 | 28.13 | 29.62 |
| 11 | H-His-D-2Nal-D- Phe-Lys-NH ₂ | 1 | 18.02 | 20.15 |
| 12 | H-Ala-His-D- 2Nal-D-Phe-Phe- NH ₂ | 1 | 28.48 | 29.48 |
| 13 | H-Ala-His-D- 2Nal-D-Phe-D- Phe-NH ₂ | 1 | 26.65 | 27.75 |
| 14 | H-Ala-His-D- 2Nal-Phe-Lys-NH ₂ | 1 | 21.85 | 23.12 |
| 15 | (3-(4-咪唑基)丙酰 基) - D - 2Nal - D - Phe - Lys- NH ₂ | 1 | 20.7 | |

| | | | | |
|----|---|---|-------|-------|
| 16 | (丙酰基)-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH ₂ | 1 | 22.2 | 23.77 |
| 17 | H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-NH ₂ | 1 | 21.7 | 23.08 |
| 18 | (H-Ala-His--D-2Nal-D-Phe-NH) 乙烷 | 3 | 34.11 | 35.78 |
| 19 | H-Ala-His-D-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂ | 1 | 14.52 | 16.7 |
| 20 | H-Ala-Ala-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH ₂ | 1 | 21.97 | 23.23 |
| 21 | ((丙酰基)-His-D-2Nal-D-Phe-NH) 乙烷 | 3 | 37.17 | 39.47 |
| 22 | 6-(H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-NH) 己胺 | 3 | 19.3 | 21.57 |
| 23 | H-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH ₂ | 1 | 15.88 | 18.25 |
| 24 | (5-氨基戊酰)-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH ₂ | 1 | 17.8 | 19.98 |

| | | | | |
|----|--|---|-------|-------|
| 25 | H-D-Lys-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH ₂ | 1 | 17.07 | 19.62 |
| 26 | H-Ala-His-D-2Nal-D-Tic-Lys-NH ₂ | 1 | 19.12 | 20.78 |
| 27 | H-D-Lys-Phe-2Nal-D-His-D-Ala-NH ₂ | 1 | 18.15 | 20.48 |
| 28 | (5-氨基戊酰)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH ₂ | 1 | 20.67 | 22.45 |
| 29 | H-D-Ala-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH ₂ | 1 | 19.57 | 21.53 |
| 30 | (丙酰基)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH ₂ | 1 | 26.7 | 27.92 |
| 31 | H-D-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH ₂ | 1 | 17.83 | 20.3 |
| 32 | H-Ala-3-Pyal-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH ₂ | 1 | 18.15 | 20.18 |
| 33 | (正丁基)-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH ₂ | 6 | 19.55 | |

| | | | | |
|----|--|---|-------|-------|
| 34 | (正辛基)-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH ₂ | 6 | 27.88 | 24.52 |
| 35 | H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe Ψ (CH ₂ NH)Lys-NH ₂ | 5 | 17.97 | 20.83 |
| 36 | (3-氯甲基苯甲酰)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH ₂ | 1 | 22.42 | 24.13 |
| 37 | (3-氯基苯乙酰)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH ₂ | 1 | 23.62 | 23.97 |
| 38 | ((4-咪唑基)-乙酰)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH ₂ | 1 | 20.42 | 22.22 |
| 39 | (3-(4-咪唑基)-丙烯酰)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH ₂ | 1 | 21.25 | 23.32 |
| 40 | (4-氯基苯乙酰)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH ₂ | 1 | 22.45 | |
| 41 | (trans-4-氯甲基环己酰)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH ₂ | 1 | 22.07 | 23.67 |

| | | | | |
|----|--|---|-------|-------|
| 42 | 2-(H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-NH)- 乙胺 | 3 | 18.6 | 20.25 |
| 43 | (2-(H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-NH) 乙基)苯 | 3 | 30.18 | 32.18 |
| 44 | 4 - ((H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-NH)甲基)苄胺 | 3 | 19.63 | 21.55 |
| 45 | (2R)-(H-Ala-His-D-2Nal-NH)-3-苯 丙胺 | 4 | 21.55 | 23.57 |
| 46 | 2-(H-Ala-His-D-2Nal-NH)乙胺 | 3 | 25.52 | |
| 47 | H-D-Phe-Ala-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH ₂ | 1 | 27.82 | 29.43 |
| 48 | H-Ala-D-Phe-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH ₂ | 1 | 25.62 | 27.22 |
| 49 | H-Ala-(2-氨基苯甲酰)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH ₂ | 7 | 26.42 | 24.93 |

| | | | | |
|----|--|---|-------|-------|
| 50 | H-Aib-His-D- 2Nal-D-Phe-Lys- NH ₂ | 1 | 17.42 | 20.13 |
| 51 | H-Aib-His-D- 1Nal-D-Phe-Lys- NH ₂ | 1 | 17.55 | 19.8 |
| 52 | H-Tyr-Ala-His-D- 2Nal-D-Phe-Lys- NH ₂ | 1 | 19.9 | 21.22 |
| 53 | (吡啶-4-羧基)- D-2Nal-D-Phe- Lys-NH ₂ | 1 | 20.4 | 22.32 |
| 54 | H-Ala-Phe(4- NH ₂)-D-2Nal-D- Phe-Lys-NH ₂ | 1 | 19.20 | — |

例 55

((丙酰基) - D - 2Nal - D - Phe-NH) 己烷

用与例 3 类似的方法, 由取代能力为 0.96mmol/g 的 Sasrin 树脂合成肽树脂 (丙酰基) - D - 2Nal - D - Phe - Sasrin 树脂.

对所得到的 105mg 树脂进行氨解作用.

通过在室温下与 1ml 正己胺一起搅拌 20 小时, 将肽 ((丙酰基) - D - 2Nal-D-Phe-NH) 己烷从 105mg 的丙酰基 - D - 2Nal-D-Phe-Sasrin 树脂上裂解下来. 滤去废树脂并用 1ml DMF

提取。将合并的滤液和提取液在搅拌条件下加入 8ml 1M 氢氟酸中。通过加入约 70ml CH₃CN 将所得沉淀物重新溶解，然后加入 20ml H₂O 进行再沉淀。滤出沉淀物，用水洗涤并干燥。产量为 12mg。

按照例 1 所述方法对产物进行鉴定，所不同的是，用类似于 B1 的条件仅进行一个 HPLC 分析，与 B1 条件不同的是用 0.1 % TFA/H₂O - 90 % CH₃NH/0.1 % TFA/H₂O 梯度液在 50 分钟内洗脱。保留时间为 35.73 分钟。

例 56

(3-氨基氧甲基苯甲酰) - D - 2Nal-D-Phe-Lys-NH₂

用类似于例 7 的方法，由取代能力为 0.72mmol/g 的 MBHA 树脂合成肽树脂 (3-氨基氧甲基苯甲酰) - D - 2Nal-D-Phe-Lys(Cl - Z) - MBHA。

按照 Kaljuste, K. 和 Uden, A. 的方法 (Int. J. Peptide Protein Res. 42 118-124, 1993) 将所得到的肽树脂甲基化。将 300mg 树脂与由 8ml DCM、150 μl DIEA (二乙基异丙胺) 和 39mg 4, 4'-二甲氧基二苯甲基氯 (DOD - Cl) 组成的混合物一起搅拌 2 小时，然后过滤分离并用 DCM 和 DMF 洗涤。将 DOD 保护的肽树脂与 18ml 溶于 DMF 中的 3.7 % 甲醛溶液一起搅拌，加入 0.18ml 乙酸和 180mg Na CNBH₃ 并继续搅拌 18 小时。通过过滤分离树脂，并用 DMF 和 DCM 洗涤。通过用 2 × 3ml DCM/TFA 1:1 分别处理 5 分钟和 30 分钟去除 DOD 保护，用 DCM 洗涤肽树脂，然后在真空中干燥。

用类似于例 7 的方法将所得 N - 甲基化的肽从 370mg 树脂上

裂解下来，并按照例 1 所述方法提纯和鉴定。产量为 17.3mg。

用条件 A1 和 B1 进行 RP - HPLC 分析所得到的保留时间分别为 22.83 分钟和 24.60 分钟。

例 57

(3 - 二甲基氨基甲基苯甲酰) - D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂

用类似于例 7 的方法，由取代能力为 0.72mmol/g 的 MBHA 树脂合成肽树脂 (3 - 氨基甲基苯甲酰) - D - 2Nal-D-Phe-Lys(Cl-Z)-MBHA 树脂。

将 650mg 所得肽树脂与 20ml 溶于 DMF 中的 1% 乙酸和 45 μ l 溶于 DMF 中的 3.7% 甲醛溶液一起搅拌。然后加入 55mg NaCNBH₃ (85%)，并继续搅拌 18 小时。通过过滤分离树脂，并用 DMF、DCM/MeOH, 6:4 和 DCM 洗涤。

用类似于例 7 的方法将所得到的 N, N - 二甲基化肽的混合物从 631mg 树脂上裂解下来，并按照例 1 所述方法进行提纯和鉴定。产量为 8.58mg。

用条件 A1 和 B1 进行 RP - HPLC 分析所得到的保留时间分别为 31.58 分钟和 33.00 分钟。

例 58

(3 - 氨基 - 3 - 甲基丁酰) - D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂

用类似于例 1 的方法，由 2g 取代能力为 0.39mmol/g 的 4 - ((2',4' - 二甲氧苯基) - (Fmoc-氨基) 甲基) - 苯氧基树脂 (Rink 树脂) (Novabiochem, Bad Soden, Germany, cat.#:01-64-0013) 合成肽树脂 H - D - 2Nal-D-Phe-Lys(Boc)-Rink 树脂。

将所得到的 500mg 肽树脂 (0.15mmol) 悬浮于 4ml

DCM/MeOH 1:1 中。加入 42 μ l 三乙胺 (0.3mmol)，并在冷却至 0℃ 以后在搅拌条件下加入 31mg (0.158mmol) 2, 2 - 二甲基 - 4 - 氧 - 氮杂环丁烷 - 1 - 磺酰氯。在 0℃ 继续搅拌 20 分钟，并在室温下搅拌 90 分钟。在用 DCM/MeOH 6: 4 洗涤树脂并真空干燥之后，用类似于例 1 的方法将粗肽从树脂上裂解下来并提纯。产量为 41.81mg。

用 A1 和 B1 条件进行 RP - HPLC 分析所得保留时间分别为 21.35 分钟和 22.95 分钟。

例 59

(2S) - ((3 - 氨基苯甲酰) Ψ (CH₂NH) D - 2Nal-D-Phe-NH) -6-氨基己醇

用类似于例 3 的方法，由取代能力为 0.87mmol/g 的 980mg Sasrin 树脂合成肽树脂 H-D-2Nal-D-Phe-Lys(Boc)-Sasrin 树脂。

用 Boc - 3 - 氨基苯甲醛对 1.4g 上述树脂进行还原性烷基化，并将肽从 1.0g 所得树脂上裂解下来，用类似于例 5 的方法对一半粗制产物进行提纯。产量为 18.46mg。

用 A1 和 B1 条件进行 RP - HPLC 分析所得到的保留时间分别为 14.78 分钟和 17.40 分钟。

例 60

(2 - 氨基苯甲酰) - D - 2Nal-D-Phe-Lys-NH₂

用类似于例 1 的方法，由取代能力为 0.39mmol/g 的 2g 4 - (2',4' - 二甲氧苯基) - (Fmoc-氨基) 甲基 - 苯氧基树脂 (Rink 树脂) (Novabiochem, Bad Soden, Germany, cat.#:01-64-0013) 合成肽树脂 H - D-2Nal-D-Phe-Lys(Boc)-Rink 树脂。

在 10ml DMF 中将 300mg 所得肽树脂 (0.096mmol) 与 54mg 邻苯二甲酰 - 2 - 氨基苯甲酸 (0.192mmol)、182mg HBTU (0.480mmol) 和 164 μ l DIEA (0.96mmol) 一起搅拌 18 小时。

在用 DMF、DCM/MeOH 6: 4 和 DCM 洗涤树脂, 并真空干燥之后, 通过在室温下与由 3ml TFA、225mg 苯酚、75 μ l 乙二硫醇、150 μ l 苯硫基甲烷和 150 μ l H₂O 组成的混合物一起搅拌 180 分钟, 将 (邻苯二甲酰 - 2 - 氨基苯甲酰) - D - 2Nal-D-Phe-Lys-NH₂ 从 290mg 肽树脂裂解下来。过滤裂解混合物, 用 1ml TFA 洗涤残余的树脂, 并通过氮气流将滤液浓缩至 1ml。用 50 μ l 乙醚将粗制肽从上述油状物中沉淀出来, 并用 50ml 乙醚洗涤 3 遍。然后将沉淀物溶于 50 μ l H₂O 中并冷冻干燥。在 70 $^{\circ}$ C 温度下, 在 5ml 乙醇中将所得粉状物与 0.5ml 水合肼一起搅拌 6 小时, 然后用 50ml H₂O 稀释并冷冻干燥。

通过加入 2ml 乙酸、2ml 乙醇和 100ml H₂O 溶解冷冻干燥产物, 并用类似于例 1 的方法提纯。产量 9.43mg。

用条件 A1 和 B1 进行 RP - HPLC 分析所得保留时间分别为 23.22 分钟和 25.05 分钟。

例 61

H-Aib-His Ψ (CH₂NH) D - 2Nal - D - Phe - Lys - OH

用类似于例 5 的方法合成标题中的肽, 不同的是, 将 1050mg 取代能力为 0.87mmol/g 的 Sasrin 树脂 (2 - 甲氧基 - 4 - 烷氧苄基醇树脂) (Bachem, Bubendorf, Switzerland, cat.#:D-1295) 用于合成, 而且用于将第一个氨基酸残基与树脂偶联的方案是, 由 4

- 二甲基氨基吡啶催化的预先制备的对称酐的偶联, 随后用苯甲酸酐对树脂上的残余 - OH 基进行封端。在将 752mg 肽树脂裂解并按例 1 所述方法将 7/10 所得的粗制产物提纯之后, 获得 36.76mg 产物。

按例 1 所述方法对最终产物进行鉴定。采用洗脱条件 A1 和 B1 的保留时间分别为 13.90 分钟和 17.42 分钟。

例 62

H - Aib-His-N-Me-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂

用类似于例 56 的方法, 由取代能力为 0.72mmol/g 的 MBHA 树脂合成肽树脂 H-N-Me-D-2Nal-D-Phe-Lys(Cl-Z)-MBHA 树脂。

通过与 Boc-His(Bom)-OH 和 Boc-Aib-OH 偶联, 将 458mg 的上述树脂用于合成 H - Aib-His(Bom)-N-Me-D-2Nal-D-Phe-Lys(Cl-Z)-MBHA。然后将 N - 甲基化的肽从 469mg 所得树脂上裂解下来, 并按例 1 所述方法对 1/2 粗制肽进行提纯和鉴定。产量为 23.5mg。

用条件 A1 和 B1 进行 RP - HPLC 所得到的保留时间分别为 17.62 分钟和 19.95 分钟。

例 63

(糠基) - Aib-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂

用类似于例 1 的方法, 由取代能力为 0.43mmol/g 的 4 - ((2'4' - 二甲氧苯基) - (Fmoc-氨基) 甲基) - 苯氧基在树脂 (Rink 树脂) (Novabiochem, Bad Soden, Germany, cat.#:01-64-0013) 合成肽树脂 H - Aib-His(Trt)-D-Nal-D-Phe-Lys(Boc)-Rink 树脂。

然后将所得 300mg 肽树脂与 5ml 溶于 DMF 的 1% 乙酸和 410 μ l 咪喃-2-醛搅拌。在 15 分钟和 180 分钟之后加入 231mg NaCNBH₃(85%)。持续搅拌 18 小时。过滤分离树脂，并用 DMF、DCM/MeOH 6: 4 和 DCM 洗涤。

将 N-烷基化的肽从所得 319mg 树脂上裂解下来，按照例 1 所述方法提纯和鉴定。产量为 44.8mg。

采用条件 A1 和 B1 进行 RP-HPLC 分析所得到的保留时间分别为 19.45 分钟和 22.23 分钟。

例 64

N, N-二-(2R-羟基-丙基)-3-氨基苯甲酰)
-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂

用类似于例 7 的方法，由取代能力为 0.72mmol/g 的 4-甲基二苯甲基胺(MBHA)树脂 (Biss-endorf Biochemicals, Hannover, Germany, cat.#:RMIS50) 合成肽树脂 (3-氨基苯甲酰)-D-2Nal-D-Phe-Lys(Cl-Z)-MBHA 树脂。

然后，将所得 500mg 肽树脂与 12.5ml 溶于 DMF 中的 1% 乙酸和 410 μ l 2-(R)-(四氢咪喃-2(R, S)-基氧丙醛一起搅拌。5 分钟后加入 213mg NaCNBH₃(85%)。继续搅拌 18 小时。过滤分离树脂，并用 DMF、DCM/MeOH 6: 4 和 DCM 洗涤。

将 N, N-二烷基化肽从所得到的 490mg 树脂上裂解下来，并按照例 7 所述方法进行提纯和鉴定。产量为 20.72mg。

用条件 A1 和 B1 进行 RP-HPLC 分析所得到的保留时间分别为 23.4 分钟和 25.33 分钟。

例 65 - 110

| 例 | 肽 | 用类似于以下实施例的方法进行制备 | 条件 A1 的 RP - HPLC 保留时间 (例 1) | 条件 B1 的 RP - HPLC 保留时间 (例 1) |
|----|--|------------------|------------------------------|------------------------------|
| 65 | H-Ala-N-Me-(2-氨基甲酰)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH ₂ | 7 | 24.47 | 26.27 |
| 66 | (4-氨基苯甲酰)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH ₂ | 1 | 22.22 | 23.5 |
| 67 | H-His-Ala-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH ₂ | 1 | 19.90 | 21.45 |
| 68 | (2S)-(H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-NH)-1,6-二氨基己烷 | 8 | 17.05 | 19.07 |
| 69 | 4-(H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-NH)丁胺 | 3 | 18.65 | 20.08 |
| 70 | 3-(H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe-NH)丙胺 | 3 | 18.42 | 19.80 |
| 71 | (3-氨基苯甲酰)-D-hPhe-D-Phe-Lys-NH ₂ | 7 | 20.33 | 21.95 |

| | | | | |
|----|---|----|-------|-------|
| 72 | (3-氯甲基苯甲酰) Ψ (CH ₂ NH)D-2Nal-D- Phe-Lys-NH ₂ | 5 | 14.17 | 17.23 |
| 73 | (3-氯甲基苯甲酰)-D- 2Nal-D-hPhe-Lys-NH ₂ | 7 | 25.30 | 26.58 |
| 74 | (3-氨基-3-甲基丁酰)- His-D-2Nal-D-Phe-Lys- NH ₂ | 58 | 18.12 | 20.20 |
| 75 | (3-氯甲基苯甲酰)-D- 2Nal-N-Bzl-Gly-Lys- NH ₂ | 7 | 25.33 | 26.70 |
| 76 | (2S)-((3-氯甲基苯甲 酰)-D-2Nal-D-Phe- NH)-6-氨基己醇 | 4 | 22.95 | 24.32 |
| 77 | (3-氯甲基苯甲酰)-D- 2Nal-D-Thial-Lys-NH ₂ | 7 | 22.13 | 23.23 |
| 78 | (2S)-(H-Aib-His Ψ (CH ₂ NH)D-2Nal-D- Phe-NH)-6-氨基己醇 | 59 | 12.83 | 17.27 |
| 79 | (3-氯甲基苯甲酰)-D- 2Nal-D-3Pyal-Lys-NH ₂ | 1 | 15.10 | 16.87 |
| 80 | (3-氯甲基苯甲酰)-D- 2Nal-D-Phe(4-F)-Lys- NH ₂ | 7 | 23.40 | 24.63 |

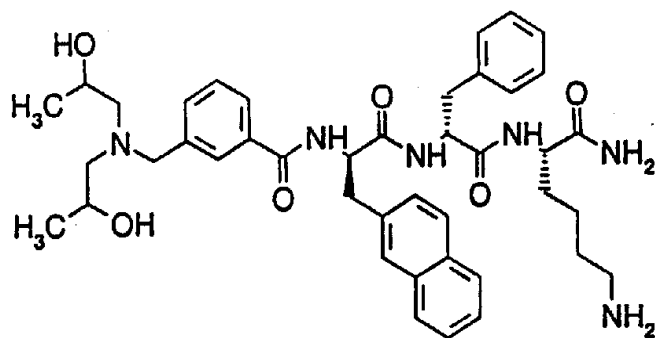
| | | | | |
|----|--|---|-------|-------|
| 81 | (3-氯甲基苯甲酰)-D-2Nal-D-Phe(4-OMe)-Lys-NH ₂ | 7 | 22.50 | 23.90 |
| 82 | 2-(H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-NH)乙烷 | 3 | 18.30 | 20.47 |
| 83 | H-Aib-Phe-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH ₂ | 1 | 29.25 | 30.55 |
| 84 | 2-(H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-NH-(1-甲基-2-吡咯烷基)乙烷 | 3 | 18.70 | 20.80 |
| 85 | 2-(H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-NH)-(2-吡啶基)乙烷 | 3 | 19.20 | 20.83 |
| 86 | (3-氯甲基苯甲酰)-D-2Nal-N-Me-D-Phe-Lys-NH ₂ | 1 | 26.78 | 27.88 |
| 87 | H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-Gly-NH ₂ | 1 | 20.48 | 22.23 |
| 88 | H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-Ala-NH ₂ | 1 | 21.65 | 23.38 |
| 89 | H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-Orn-NH ₂ | 1 | 18.43 | 20.05 |

| | | | | |
|----|--|----|-------|-------|
| 90 | (5-氨基咪唑基-2-羧基)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH ₂ | 1 | 22.32 | 23.65 |
| 91 | H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-D - Lys-NH ₂ | 1 | 18.50 | 20.00 |
| 92 | H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-Dab-NH ₂ | 1 | 17.75 | 19.48 |
| 93 | H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe Ψ (CH ₂ NH)Lys-NH ₂ | 5 | 18.57 | 20.62 |
| 94 | H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-N-Me-Lys-NH ₂ | 62 | 18.03 | 20.60 |
| 95 | (3-氨基咪唑基-2-羧基)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH ₂ | 1 | 23.23 | 24.78 |
| 96 | H-Aib-His-D-2Nal-N-Me-D-Phe-Lys-NH ₂ | 1 | 21.78 | 23.53 |
| 97 | H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-N(Me) ₂ | 3 | 18.70 | 21.07 |
| 98 | (3-氨基苯甲酰)-D-1Nal-D-Phe-Lys-NH ₂ | 1 | 22.67 | 24.23 |
| 99 | H-Aib-His-D-2Nal-D-Trp-Lys-NH ₂ | 1 | 18.17 | 20.40 |

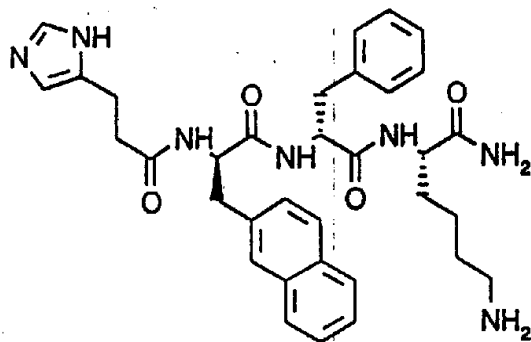
| | | | | |
|-----|--|----|-------|-------|
| 100 | (2-吡啶甲基)-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH ₂ | 63 | 19.07 | 21.73 |
| 101 | H-Aib-(3-氨基苯甲酰)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH ₂ | 7 | 23.95 | 25.38 |
| 102 | H-Aib-3Pya-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH ₂ | 1 | 18.53 | 20.38 |
| 103 | (3R)-吡啶羧基-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH ₂ | 1 | 21.52 | 22.97 |
| 104 | (2-(H-Aib-His-D-2Nal-NH)乙基)苯 | 3 | 25.55 | 27.85 |
| 105 | (2R-羟丙基)-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH ₂ | 64 | 18.15 | 20.28 |
| 106 | (3-氨基苯甲酰)-D-2Nal-D-Phe Ψ (CH ₂ NH)Lys-NH ₂ | 5 | 22.00 | 23.95 |
| 107 | (3-氨基苯甲酰)-N-Me-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH ₂ | 62 | 23.27 | 24.72 |
| 108 | (3-氨基苯甲酰)-D-2Nal-D-Phe-N-Me-Lys-NH ₂ | 67 | 22.60 | 23.98 |
| 109 | H-D-Thr-His-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH ₂ | 7 | 17.75 | 19.83 |

| | | | | |
|-----|--|---|-------|-------|
| 110 | H-Hyp-His-D-2Nal-D- Phe-Lys-NH ₂ | 7 | 17.58 | 19.37 |
|-----|--|---|-------|-------|

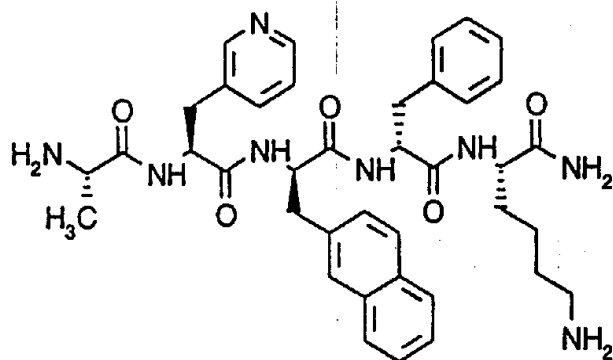
N,N- (2R- 羟丙基:)-(3-氨基苯甲酰:)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂



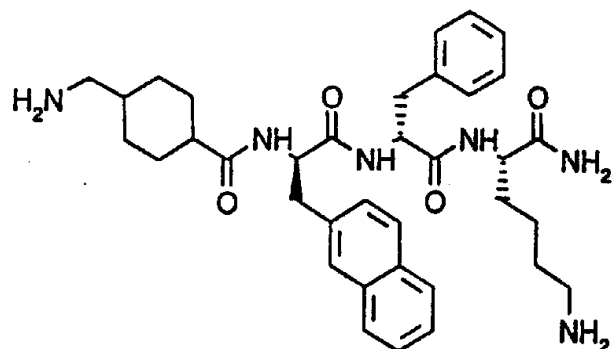
3-(4-咪唑基)丙酰基)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂



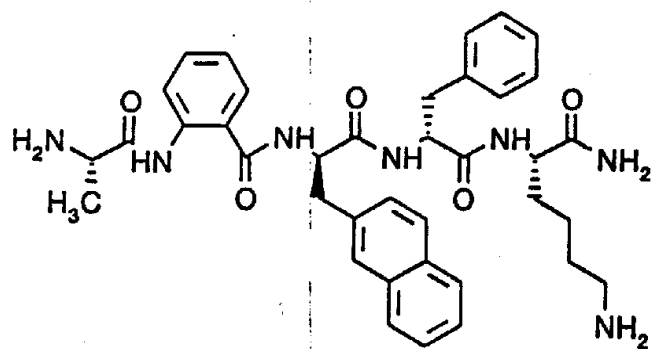
H-Ala-3Pyal-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂



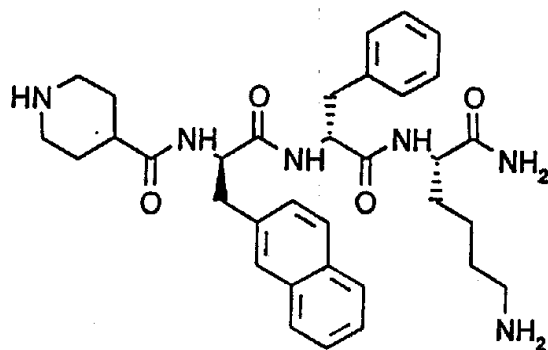
(反, 4-氨基甲基环己酰) -D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂



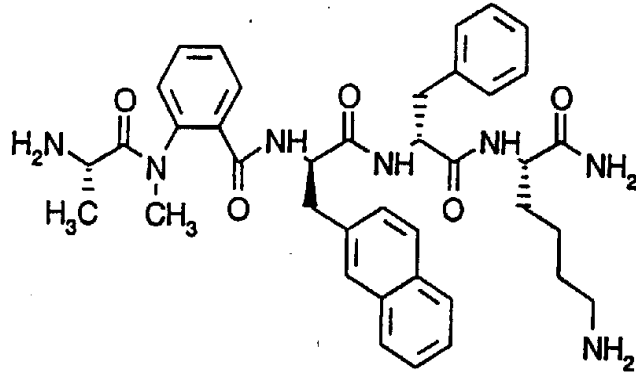
H-Ala-(2-氨基苯甲酰)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂



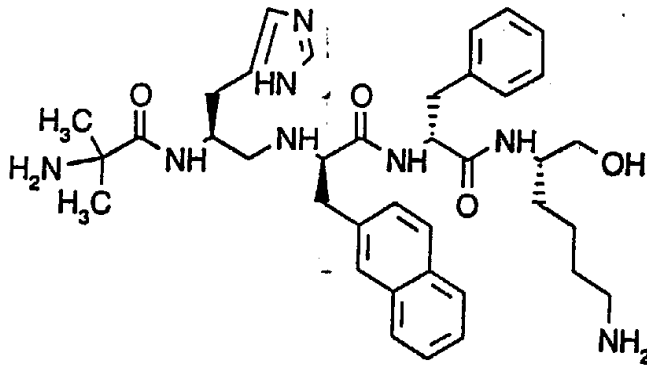
(3R)- 哌啶羧基 -D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂



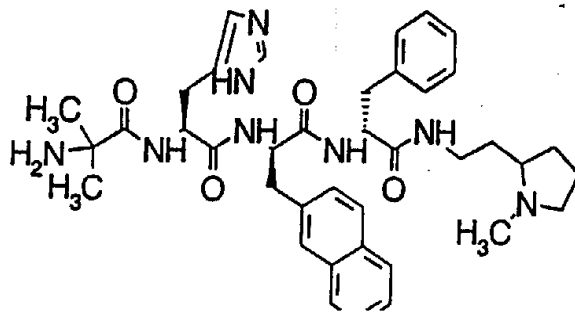
H-Ala-N-Me-(2-氨基苯甲酰)-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂



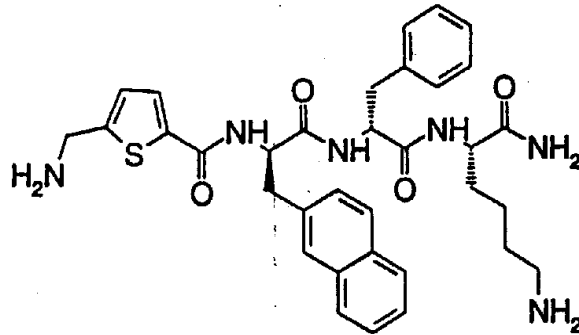
(2S)-(H-Aib-Hisψ(CH₂NH)D-2Nal-D-Phe-NH)-6-氨基己醇



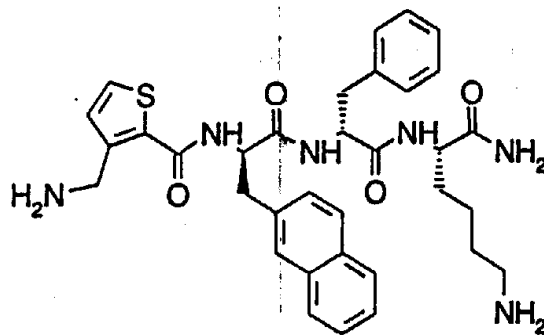
2-(H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe-NH)(1-甲基-2-吡咯烷基)乙烷



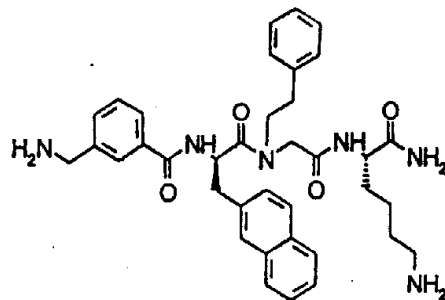
(5-氨基噻吩基)-2-羧基-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂



(3-氨基噻吩基)-2-羧基-D-2Nal-D-Phe-Lys-NH₂



(3-氨基苯甲酰基)-D-2Nal-N-(苄基)-Gly-Lys-NH₂



例 116

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、 $2 \times$ 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 $1000 \mu\text{g}$ DNase 的提取缓冲液的三角瓶中，并在 37°C ，以 95 % O_2 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 ($160 \mu\text{m}$) 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 (补充了 25mM HEPES、4mM 谷氨酰胺、0.75 % NaHCO_3 、2.5 % FCS、3 % 马血清、10 % 大鼠血清、 1nM T_3 和 $4 \mu\text{g/L}$ 地塞米松的 DMEM) 中，使密度为 2×10^5 细胞/ml。将细胞接种到微量滴定板上， $200 \mu\text{l}$ /眼，并在 37°C ，8 % CO_2 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，并加入含有本发明肽化化合物的新

激发缓冲液，在 37 °C 和 5 % CO₂ 条件下将上述滴定板温育 15 分钟。测定法收集缓冲液，并在以下的闪烁亲近测定法 (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 μl 缓冲液

10 μl 样品 (培养的激发缓冲液)

50 μl ¹²⁵I - rGH

50 μl 兔抗 - rGH

50 μl SPA 试剂 (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 °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。

| 例 | 化合物 | EC ₅₀ (nM) | E _{max} (% GHRP-6) |
|-----|---|-----------------------|-----------------------------|
| 3 | H-Ala-His-D-2Nal-D-Phe- NH-(CH ₂) ₅ NH ₂ | 20 | 100 |
| 10 | H-Ala-Phe-D-2Nal-D-Phe- Lys-NH ₂ | 2 | 90 |
| 51 | H-Ala-His-D-1Nal-D-Phe- Lys-NH ₂ | 10 | 85 |
| 76 | (2S)-((3-(氯甲基苯甲酰)- D2Nal-D-Phe-NH)-6-氯 基乙醇 | 26 | 65 |
| 83 | H-Aib-Phe-D-2Nal-D-Phe- Lys-NH ₂ | 8 | 75 |
| 88 | H-Aib-His-D-2Nal-D-Phe- Ala-Nh ₂ | 11 | 80 |
| 104 | (2-(H-Aib-His-D-2Nal-NH) 乙基)苯 | 58 | 85 |