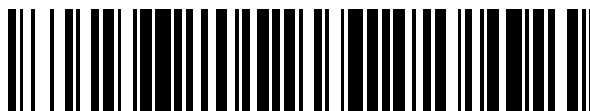


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 523 375**

51 Int. Cl.:

C07K 14/60 (2006.01)

A61K 38/25 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.09.2010** **E 10817798 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.08.2014** **EP 2478011**

54 Título: **Antagonistas de GH-RH fluorados**

30 Prioridad:

17.09.2009 US 562010

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.11.2014

73 Titular/es:

UNIVERSITY OF MIAMI (50.0%)
1600 Northwest 10th Avenue
Miami, FL 33136 , US y
UNITED STATES OF AMERICA REPRESENTED
BY THE DEPARTMENT OF VETERANS AFFAIRS
(50.0%)

72 Inventor/es:

SCHALLY, ANDREW, V.;
VARGA, JOZSEF, L.;
ZARANDI, MARTA y
CAI, REN, ZHI

74 Agente/Representante:

PÉREZ BARQUÍN, Eliana

ES 2 523 375 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

ANTAGONISTAS DE GH-RH FLUORADOS**DESCRIPCIÓN****5 Campo de invención**

La presente invención se refiere a análogos sintéticos fluorados novedosos de hGH-RH(1-30)NH₂ que inhiben la liberación de hormona de crecimiento desde la hipófisis en mamíferos así como que inhiben la proliferación de cánceres humanos y que inhiben trastornos proliferativos hiperplásicos y benignos de diversos órganos, a través de un efecto directo sobre las células cancerosas y no malignas, y a composiciones terapéuticas que contienen estos péptidos novedosos y a su uso.

Antecedentes de la invención

La hormona liberadora de hormona de crecimiento (GH-RH) es un péptido que pertenece a la familia de secretina/glucagón de hormonas neuroendocrinas y gastrointestinales, una familia que también incluye el péptido intestinal vasoactivo (VIP), el péptido activador de adenilato ciclasa hipofisiaria (PACAP) y otros. El péptido GH-RH humano (hGH-RH) está compuesto por 44 residuos de aminoácido. El sitio de producción de GH-RH mejor conocido es el hipotálamo, pero se encontró que diversos órganos periféricos también lo sintetizan. hGH-RH también se produce, en ocasiones en grandes cantidades, por tejidos malignos humanos (cánceres) de origen diverso.

La GH-RH ejerce diversas funciones fisiológicas y fisiopatológicas. La GH-RH hipotalámica es una hormona de liberación endocrina que, actuando a través de receptores de GH-RH específicos sobre la hipófisis, regula la secreción de hormona de crecimiento (GH) hipofisiaria. Las funciones fisiológicas de GH-RH en tejidos extrahipofisiarios son menos claras. Sin embargo, existe una evidencia creciente del papel de GH-RH como factor de crecimiento autocrino/paracrino en diversos cánceres. Se han descrito receptores de variante de corte y empalme (SV) para GH-RH, diferentes de los expresados en la hipófisis, en una amplia variedad de cánceres humanos y en algunos órganos periféricos normales. Las acciones de GH-RH autocrina/paracrina tumoral podrían ejercerse sobre estos receptores. Además, receptores para VIP y otros, como receptores aún no identificados de esta familia, podrían ser todos dianas de GH-RH local.

En vista del papel de GH-RH como regulador endocrino de la liberación de GH, se han concebido estrategias terapéuticas novedosas, basadas en el uso de análogos agonistas y antagonistas de GH-RH, para el tratamiento de diversos estados patológicos.

GH es un polipéptido que tiene 191 aminoácidos que estimula la producción de diferentes factores de crecimiento, por ejemplo factor de crecimiento similar a insulina I (IGF-I), y por consiguiente promueve el crecimiento de numerosos tejidos (esqueleto, tejido conjuntivo, músculo y vísceras) y estimula diversas actividades fisiológicas (aumentando la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, y aumentando la lipólisis, pero disminuyendo la secreción de urea). La liberación de GH hipofisiaria está bajo el control de factores de liberación e inhibición secretados por el hipotálamo, siendo los factores de liberación principales GH-RH y grelina, y siendo el factor de inhibición principal somatostatina.

GH se ha implicado en diversas enfermedades. Una enfermedad en la que GH está implicada es acromegalia, en la que están presentes niveles excesivos de GH. Los huesos faciales y de las extremidades agrandados de manera anómala, y los síntomas cardiovasculares de esta enfermedad pueden tratarse administrando un antagonista de GH-RH. Enfermedades adicionales que implican GH son retinopatía diabética y nefropatía diabética. El daño a la retina y los riñones respectivamente en estas enfermedades, que se cree que se debe a la hipersecreción de GH, da como resultado ceguera o reducción de la función renal. Este daño puede prevenirse o ralentizarse mediante la administración de una antagonista de GH-RH eficaz.

En un esfuerzo por intervenir en esta enfermedad y otros estados, algunos investigadores han intentado controlar los niveles de GH e IGF-I usando análogos de somatostatina, un inhibidor de la liberación de GH. Sin embargo, los análogos de somatostatina, si se administran solos, no suprimen los niveles de GH o IGF-I hasta un grado deseado. Si se administran en combinación con un antagonista de GH-RH, los análogos de somatostatina suprimirán los niveles de IGF-I mucho mejor.

Sin embargo, las aplicaciones principales de los antagonistas de GH-RH se encuentran en el campo del cáncer (revisado en Schally AV y Varga JL, Trends Endocrinol Metab 10: 383-391, 1999; Schally AV *et al*, Frontiers Neuroendocrinol 22: 248-291, 2001; Schally AV y Comaru-Schally AM, en: Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, Bast Jr. RC, Gansler TS, Holland JF, Frei III E, Eds. Cancer Medicine, 6ª ed. Hamilton, Ontario: BC. Decker, Inc., 2003, págs. 911-926). Los antagonistas de GH-RH inhiben la proliferación de tumores malignos mediante mecanismos endocrinos indirectos basándose en la inhibición de la liberación de GH hipofisiaria y dando como resultado la disminución de niveles en suero de GH e IGF-I, así como mediante efectos directos sobre el tejido tumoral.

GH-RH y sus receptores de variante de corte y empalme (SV) tumorales están presentes en cánceres humanos de pulmón, próstata, mama, ovario, endometrio, estómago, intestino, páncreas, riñón y hueso (véase Halmos G *et al*, Proc Natl Acad Sci USA 97: 10555-10560, 2000; Rekasi Z *et al*, Proc Natl Acad Sci USA 97: 10561-10566, 2000; Schally AV *et al*, Frontiers Neuroendocrinol 22: 248-291, 2001; Schally AV y Comaru-Schally AM, en: Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, Bast Jr. RC, Gansler TS, Holland JF, Frei III E, Eds. Cancer Medicine, 6ª ed. Hamilton, Ontario: BC. Decker, Inc., 2003, págs. 911-926). Se ha mostrado o se sospecha que GH-RH tumoral actúa como factor de crecimiento autocrino en estos tumores malignos. Los análogos antagonistas de GH-RH pueden inhibir la actividad estimuladora de GH-RH y ejercer efectos antiproliferativos directos *in vitro* sobre células de cáncer, e *in vivo* sobre tumores. Los efectos antiproliferativos directos de los antagonistas de GH-RH se ejercen sobre receptores tumorales (sitios de unión). Además de los receptores de SV tumorales específicos para GH-RH, receptores para VIP y otros, como receptores aún no identificados de esta familia, son dianas de antagonistas de GH-RH.

Además de los efectos inhibidores endocrinos sobre GH e IGF-I en suero, se ha encontrado que los antagonistas de GH-RH reducen la producción autocrina y paracrina de varios factores de crecimiento tumoral y/o regulan por disminución sus receptores. Estos factores de crecimiento incluyen IGF-I, IGF-II, GH, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). Por tanto, una alteración de los bucles estimuladores autocrinos/paracrinos basados en estos factores de crecimiento contribuye a la eficacia de antagonistas de GH-RH como agentes antitumorales.

IGF-I e IGF-II son factores de crecimiento autocrinos/paracrinos con efectos mitogénicos potentes sobre diversos cánceres. IGF-I también es un factor de crecimiento endocrino, y niveles elevados de IGF-I en suero se consideran un factor de riesgo epidemiológico para el desarrollo de cáncer de próstata, cáncer de pulmón y cáncer colorrectal. Está bien establecida la implicación de IGF-I (somatomedina-C) en cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de colon, tumores óseos y otros tumores malignos. No obstante, el control autocrino/paracrina de la proliferación por IGF-II también es un factor principal en muchos tumores. IGF-I e IGF-II ejercen sus efectos proliferativos y antiapoptóticos a través del receptor de IGF-I común. Los receptores para IGF-I están presentes en cánceres de mama, cánceres de próstata, cánceres de pulmón, cánceres de colon, tumores cerebrales, cánceres pancreáticos y en carcinomas de células renales humanos primarios. En varios cánceres experimentales, tales como aquellos de hueso, pulmón, próstata, riñón, mama, ovario, intestino, páncreas y cerebro, el tratamiento con antagonistas de GH-RH produce una reducción en los niveles de IGF-I y/o IGF-II, concomitante a la inhibición del crecimiento tumoral (revisado en Schally AV y Varga JL, Trends Endocrinol Metab 10: 383-391, 1999; Schally AV *et al*, Frontiers Neuroendocrinol 22: 248-291, 2001; Schally AV y Comaru-Schally AM, en: Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, Bast Jr. RC, Gansler TS, Holland JF, Frei III E, Eds. Cancer Medicine, 6ª ed. Hamilton, Ontario: BC. Decker, Inc., 2003, págs. 911-926). En algunos casos, la expresión de receptores de IGF-I también se disminuyó mediante antagonistas de GH-RH. Por tanto, la alteración de los bucles estimuladores endocrinos y autocrinos/paracrinos dependientes de IGF-I e IGF-II contribuye al efecto antitumoral de antagonistas de GH-RH.

En el modelo de cáncer de mama MXT, el tratamiento con antagonistas de GH-RH inhibió el crecimiento tumoral, redujo el nivel de ARNm para GH y la concentración de péptido GH en tumores, e inhibió la expresión de ARNm para receptores de GH (Szepeshazi K *et al*, Endocrinology 142: 4371-4378, 2001). Se mostró que GH actúa como factor de crecimiento para células de carcinoma mamario murino MXT, células de cáncer de mama humano MCF-7 y otras líneas de células tumorales. Por tanto la actividad inhibidora de antagonistas de GH-RH sobre niveles locales y en suero de GH contribuye a su efecto antitumoral.

Se ha mostrado que antagonistas de GH-RH inhiben los niveles de ARNm y concentraciones de proteína de VEGF en modelos de cáncer de próstata sensibles a andrógenos e independientes de andrógenos humano (Letsch M *et al*, Proc Natl Acad Sci USA 100: 1250-1255, 2003; Plonowski A *et al*, Prostate 52: 173-182, 2002) y este fenómeno contribuye a su efecto antitumoral, puesto que VEGF desempeña un papel estimulador importante en la neovascularización y el crecimiento de diversos tumores. Además, se encontró que un antagonista de GH-RH inhibía la secreción de VEGF y la proliferación de células endoteliales murinas normales, aparentemente a través de un efecto directo sobre estas células *in vitro* (Siejka A *et al*, Life Sci 72: 2473-2479, 2003).

Los científicos han investigado diversas modificaciones de GH-RH para dilucidar la relación de la estructura de GH-RH con su actividad sobre los receptores hipofisarios, en un esfuerzo por proporcionar congéneres sintéticos con propiedades agonistas o antagonistas mejoradas. Por tanto, se estableció de manera temprana que el fragmento de GH-RH que comprende los residuos 1 a 29, o GH-RH(1-29), es la secuencia mínima necesaria para la actividad biológica sobre la hipófisis. Este fragmento conserva el 50% o más de la potencia de la GH-RH nativa. Posteriormente, se prepararon muchos análogos sintéticos de GH-RH, basándose en la estructura del péptido hGH-RH(1-29)NH₂. hGH-RH(1-29)NH₂ tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile⁵-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr¹⁰-Arg-Lys-Val-Leu-Gly¹⁵-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg²⁰-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp²⁵-Ile-Met-Ser-Arg²⁹-NH₂

Un número considerable de patentes y artículos en la bibliografía pública dan a conocer análogos de GH-RH que actúan o bien como agonistas de GH-RH (es decir actúan estimulando la liberación de GH) o bien como

antagonistas de GH-RH (es decir actúan inhibiendo la liberación de de GH) sobre la hipófisis. La mayoría de estos péptidos se derivan de la secuencia peptídica de GH-RH(1-29), con modificaciones estructurales específicas que explican sus propiedades agonistas o antagonistas potenciadas sobre los receptores hipofisarios. Sin embargo, aparte de algunas excepciones, se conoce cómo se comportarían estos análogos sobre células de cáncer que expresan receptores de GH-RH diferentes de los encontrados en la hipófisis. Sólo algunos estudios científicos publicados han intentado dilucidar las relaciones de estructura-actividad y caracterizar los efectos antagonistas (o agonistas) directos de análogos de GH-RH sobre células de cáncer y tumores (véase Rekasi Z *et al*, *Endocrinology* 141: 2120-2128, 2000; Halmos G *et al*, *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 10555-10560, 2000; Rekasi Z *et al*, *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 10561-10566, 2000; Kiaris H *et al*, *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 196-200, 2002), y ninguna patente expedida ha tratado este tema hasta la fecha. Por consiguiente, se sabe muy poco sobre las características estructurales en análogos de GH-RH requeridos para una acción antagonista directa sobre células tumorales.

Se encontró que el antagonista de GH-RH descrito en primer lugar, [Ac-Tyr¹, D-Arg²]hGH-RH(1-29)NH₂ que se denomina generalmente "antagonista patrón" en la bibliografía, evitaba la activación de adenilato ciclasa hipofisaria de rata por hGH-RH(1-29)NH₂. El mismo péptido bloqueó la acción de GH-RH en sus receptores en la hipófisis y el hipotálamo, e inhibió la secreción pulsátil de la hormona de crecimiento. El antagonista patrón también se evaluó clínicamente (Ocampo-Lim B *et al*, *J Clin Endocrinol Metab* 81: 4396-4399, 1996; Jaffe CA *et al*, *J Clin Endocrinol Metab* 82: 634-637, 1997). Grandes dosis de este antagonista (400 µg/kg) eliminó la secreción nocturna de GH en sujetos normales e inhibió la respuesta a GH-RH. El antagonista de GH-RH patrón también redujo los niveles de GH en un paciente con acromegalia. Sin embargo, para su uso clínico, se requieren antagonistas de GH-RH mucho más potentes.

Las invenciones mencionadas a continuación dan a conocer análogos de GH-RH con propiedades antagonistas o agonistas sobre los receptores hipofisarios para GH-RH. Sin embargo, no se notificó ni se investigó si estos análogos podrían ejercer efectos directos sobre células tumorales.

La patente estadounidense 4.659.693 da a conocer análogos antagonistas de GH-RH que contienen determinados residuos de N,N'-dialquil-omega-guanidino alfa-aminoácido en la posición 2 de la secuencia de GH-RH(1-29).

La solicitud publicada WO 91/16923 revisa intentos anteriores de alterar la estructura secundaria de hGH-RH modificando su secuencia de aminoácidos. Estos intentos anteriores incluyen: sustituir Tyr¹, Ala², Asp³ o Asn⁸ con sus D-isómeros; sustituir Asn⁸ con L- o D-Ser, D-Arg, Asn, Thr, Gln o D-Lys; sustituir Ser⁹ con Ala para potenciar la anfifilia de la región; y sustituir Gly¹⁵ con Ala o Aib. Cuando R² en los análogos es D-Arg, y R⁸, R⁹ y R¹⁵ están sustituidos tal como se indica anteriormente, se dice que se da como resultado actividad antagonista. Se dice que estos péptidos antagonistas son adecuados para la administración como composiciones farmacéuticas para tratar estados asociados con niveles excesivos de GH, por ejemplo, acromegalia.

Se dijo que la actividad antagonista del análogo de hGH-RH "[Ser⁹-psi[CH₂-NH]-Tyr¹⁰]hGH-RH(1-29) de la patente estadounidense 5.084.555 resulta de un enlace pseudopeptídico (es decir, un enlace peptídico reducido a una unión [CH₂-NH]) entre los residuos R⁹ y R¹⁰. Sin embargo, se dijo que las propiedades antagonistas de [Ser⁹-psi[CH₂-NH]-Tyr¹⁰]hGH-RH(1-29) (SEQ ID NO: 98) eran inferiores al antagonista patrón, [Ac-Tyr¹, D-Arg²]hGH-RH(1-29)-NH₂. La patente estadounidense 5.550.212, la patente estadounidense 5.942.489 y la patente estadounidense 6.057.422, dan a conocer análogos de hGH-RH(1-29)NH₂ que se dice que tienen propiedades antagonistas potenciadas y duración de la acción prolongada con respecto a la inhibición de la liberación de GH provocada por GH-RH. Se cree que estas propiedades resultan del remplazo de diversos aminoácidos y acilación con ácidos aromáticos o no polares en el extremo N-terminal de GH-RH(1-29)NH₂. Las propiedades inhibitorias tumorales de antagonistas caracterizadas en la patente estadounidense 5.942.489 y la patente estadounidense 6.057.422 se han demostrado usando ratones atímicos que portan xenoinjertos de modelos de cáncer humano experimentales. Se observa que en la patente estadounidense 5.550.212 y en la patente estadounidense 5.942.489, R⁹ es siempre Ser, mientras que R¹¹ y R²⁰ pueden ser o bien Arg, D-Arg o bien Cit. En el caso de la patente estadounidense 6.057.422, R⁹ puede ser o bien Arg, Har, Lys, Orn, D-Arg, D-Har, D-Lys, D-Orn, Cit, Nle, Tyr(Me), Ser, Ala o bien Aib, mientras que R¹¹ y R²⁰ son siempre Arg. La publicación de solicitud PCT WO2005/016953 da a conocer diversos análogos de GH-RH que inhiben la actividad de hGH-RH endógena sobre los receptores de GH-RH hipofisaria, y evitan la liberación de hormona de crecimiento. Los análogos también inhiben la proliferación de cánceres humanos a través de un efecto directo sobre las células de cáncer.

La publicación de solicitud PCT WO2000/031136 da a conocer diversos análogos de GH-RH que inhiben las rutas de señalización de GH-RH e IGF-I. Sin embargo, estos análogos carecen de las sustituciones de fenilalanina mono o polifluorada en la posición 10.

Se observa que ninguna técnica anterior publicada da a conocer la síntesis y el uso de análogos de GH-RH con sustitución de fenilalanina di o polifluorada en la posición 10.

Sumario de la invención

Se proporciona una serie novedosa de análogos sintéticos de hGH-RH(1-29)NH₂ y hGH-RH(1-30)NH₂. Estos

análogos inhiben la liberación de hormona de crecimiento desde la hipófisis en mamíferos así como inhiben la proliferación de cánceres humanos a través de un efecto directo sobre las células de cáncer. Las potencias inhibitoras más fuertes de los nuevos análogos, en comparación con los descritos anteriormente, resultan del remplazo de diversos aminoácidos.

5 La invención se refiere principalmente a un péptido seleccionado del grupo que tiene las fórmulas: $[R_1-A^0, A^1, A^2, A^6, A^8, A^9, A^{10}, A^{11}, A^{12}, A^{13}, A^{15}, A^{17}, A^{19}, A^{20}, A^{21}, A^{22}, A^{23}, A^{27}, A^{28}, A^{29}, A^{30}]_nGH-RH(1-30)-R_2$

en las que

10 R_1 es un miembro del grupo que consiste en

a) ácido fenilacético o ácido fenilpropiónico mono o polifluorado en el anillo aromático;

15 b) H, PhAc, Fpr, 1-Nac, 2-Nac, 1-Npr, 2-Npr, Ibu, Dca, Fer, Tfa;

c) $CH_3(CH_2)_nCO$, $HOOC(CH_2)_nCO$, en los que n es un número entero de desde 2 hasta 24; y d) cualquier otro grupo carboxilo alifático de 6-18 átomos de carbono de cadena lineal, cíclico, de cadena ramificada, saturado, insaturado o poliinsaturado y cualquier ácido carboxílico que contiene 3-8 carbonos con anillo aromático o

20 A^0 es un miembro del grupo que consiste en

25 a) un Oaa con de 4 a 24 átomos de carbono, que contiene una cadena carbonada alifática o bien lineal o bien ramificada, saturada, insaturada o poliinsaturada, incluyendo, pero sin limitarse a ω -Aha, ω -Aoc y ω -Ada;

b) un dímero Oaa-Oaa unido mediante un enlace amida entre el grupo carboxilo del primer Oaa y el átomo de N del segundo Oaa;

30 c) un trímero Oaa-Oaa-Oaa; y

d) Phe, D-Phe, Arg, D-Arg, o está ausente.

35 A^1 es L-Fpa, D-Fpa, Tyr, D-Tyr, His o D-His,

A^2 es D-Arg, D-Har, D-Cit o D-Amp,

A^6 es Fpa, Cpa, Phe, Tyr, Nal, o Phe(Y), en el que Y= Cl, Br o I

40 A^8 es Asn, D-Asn, Cit, D-Cit, Gln, D-Gln, Ser, D-Ser, Thr, D-Thr, Ala, D-Ala, N-Me-Ala, N-Me-D-Ala, Abu, D-Abu o Aib,

A^9 es Har, D-Har, Arg, D-Arg, Fpa, D-Fpa, His, D-His, Amp, D-Amp, Gup o D-Gup,

45 A^{10} es Phe di o polifluorada (en el anillo aromático): Fpa2, Fpa3, Fpa4 o Fpa5,

A^{11} es His, D-His, Arg, D-Arg, Cit, D-Cit, Har, D-Har, Amp, D-Amp, Gup o D-Gup,

50 A^{12} es Lys, D-Lys, Lys(Me)₂, Lys(iPr), Orn, D-Orn, Har, D-Har, Cit, D-Cit, Nle, D-Nle, Ala o D-Ala,

A^{13} es Fpa, Val o Leu,

A^{15} es Fpa, Gly, Ala, Abu, Aib, Nle, Gln, Cit o His,

55 A^{17} es Leu o Glu,

A^{19} es Ala o Abu,

A^{20} es His, D-His, Arg, D-Arg, Har, D-Har-, Amp, D-Amp, Cit o D-Cit,

60 A^{21} es Lys, D-Lys, Lys(Me)₂, Lys(iPr), Orn, D-Orn, Har, D-Har, Cit o D-Cit,

A^{22} es Fpa, Leu, Tyr, Ala o Aib,

65 A^{23} es Fpa, Leu, Tyr, Ala o Aib,

A²⁷ es Nle, Met, Leu, Ala, Abu, α -Apa, α -Ahea o α -Aoc,

A²⁸ es Arg, D-Arg, Har, D-Har, Ser, Asn, Asp, Ala, Abu o Cit,

5 A²⁹ es Arg, D-Arg, Har, D-Har, Cit, D-Cit o Agm,

A³⁰ es Oaa, dímero Oaa-Oaa, trímero Oaa-Oaa-Oaa, β -Ala, $-\text{NH}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-(\text{CH}_2)_m-\text{CO}-$ en el que n es un número entero de desde 1 hasta 30, m es un número entero de desde 1 hasta 18, Arg, D-Arg, Har, D-Har, Cit, D-Cit, Agm, o está ausente,

10 R₂ es -NH₂, -NH-NH₂, -NH-OH, -NHR₃, -NR₃R₄, -OH u -OR₃, en el que R₃ y R₄ se seleccionan del grupo que consiste en alquilo C₁₋₁₀, alquenilo C₂₋₁₀, alquinilo C₂₋₁₀, -C₆H₅, y mono o difenilalquilo C₁₋₁₈;

siempre que cuando A¹⁷ es Leu y A³⁰ es Ada, entonces A¹⁵ es distinto de Abu,

15 además siempre que si A²⁹ es Agm entonces A³⁰ y R₂ están ausentes, y si A³⁰ es Agm entonces R₂ está ausente,

y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

20 De estos péptidos los preferidos son aquéllos en los que

A⁰ es un miembro del grupo que consiste en

ω -Aha, ω -Amc y ω -Ada.

25 De estos péptidos los particularmente preferidos son aquéllos en los que, el sustituyente en al menos un miembro del grupo que consiste en A¹, A⁶, A¹⁰, A¹³, A¹⁵ o A²² es Phe di o polifluorada.

R₁ es un ácido fenilacético o ácido fenilpropiónico que está polifluorado en el anillo aromático.

30 Entre estos péptido los especialmente preferidos son aquéllos en los que, el sustituyente en al menos un miembro del grupo que consiste en A¹, A⁶ o A¹⁰, es Fpa3, Fpa4 o Fpa5.

Los péptidos de mayor interés son aquéllos seleccionados del grupo que tiene las fórmulas:

35 R₁-A⁰, A¹, D-Arg², A⁶, A⁸, Har⁹, A¹⁰, His¹¹, Orn¹², Val¹³, A¹⁵, A¹⁷, Ala¹⁹, His²⁰, Orn²¹, Leu²², Leu²³, Har²⁸-D-Arg²⁹, A³⁰]hGH-RH(1-30)-R₂

en las que:

40 R₁ es Ac, PhAc, CH₃-(CH₂)₁₀-CO- o PhF₅Ac,

A⁰ es Ada, Amc, o está ausente,

45 A¹ es Tyr o Fpa5,

A⁶ es Cpa o Fpa5,

A⁸ es Ala o Me-Ala,

50 A¹⁰ es Fpa5,

A¹⁵ es His, Abu o Ala,

55 A¹⁷ es Leu o Glu,

A³⁰ es Ada, Agm, o está ausente,

R₂ es -NH₂, -OH, o está ausente

60 Se observa que los residuos de aminoácido de 30 a 44 de la molécula de GH-RH nativa no parecen ser esenciales para la actividad; ni su identidad parece ser crítica. Por tanto, parece que la adición de parte o todos de estos residuos de aminoácido adicionales al extremo C-terminal de los análogos de hGH-RH(1-29)NH₂ (SEQ ID NO: 96) y hGH-RH(1-30)NH₂ de la presente invención no afectará a la eficacia de estos análogos como antagonistas de GH-RH.

65

Si se añadieran parte o todos de estos aminoácidos al extremo C-terminal de los análogos de hGH-RH(1-29)NH₂, los residuos de aminoácido añadidos podrían ser iguales a los residuos 30 a 44 en la secuencia de hGH-RH nativa o equivalentes razonables.

5 Métodos de síntesis.

Los péptidos sintéticos se sintetizan mediante un método adecuado tal como mediante técnicas en fase sólida exclusiva, mediante técnicas en fase sólida parcial, mediante condensación de fragmentos o mediante síntesis en fase de disolución clásica. Cuando se sintetizan los análogos de esta invención mediante el método en fase sólida, el residuo del extremo C-terminal (en el presente documento, A²⁹ o A³⁰) se une (ancla) de manera apropiada a un soporte sólido inerte (resina) mientras porta grupos protectores para su grupo amino alfa u omega (y, cuando sea apropiado, para su grupo funcional de cadena lateral). Tras completarse esta etapa, se retira el grupo protector de amino alfa (u omega) del residuo de aminoácido anclado y se añade el siguiente residuo de aminoácido, A²⁸ o A²⁹ respectivamente, que tiene su grupo amino alfa (así como cualquier grupo funcional de cadena lateral apropiado) protegido de manera adecuada, etc. Se retiran los grupos protectores del extremo N-terminal después de añadirse cada residuo, pero aún no se retiran los grupos protectores de cadena lateral. Tras haberse unido todos los aminoácidos deseados en la secuencia apropiada, se escinde el péptido del soporte y se libera de todos los grupos protectores de cadena lateral en condiciones que son mínimamente destructivas para los residuos en la secuencia. Esto va seguido por una purificación cuidadosa y caracterización escrupulosa del producto sintético, para garantizar que la estructura obtenida es realmente la deseada.

Particularmente se prefiere proteger la función amino alfa (o la función amino omega, cuando se aplicable) de los aminoácidos durante la etapa de acoplamiento con un grupo protector sensible a ácido o base. Tales grupos protectores deben tener las propiedades de ser estables en las condiciones de formación de enlace peptídico, pudiendo retirarse al mismo tiempo fácilmente sin destrucción de la cadena peptídica creciente y sin racemización de cualquiera de los centros quirales contenidos en la misma. Los grupos protectores de amino alfa y omega son Boc y Fmoc.

30 Aplicaciones médicas.

Los péptidos antagonistas de hGH-RH, o sales de estos péptidos, pueden formularse en formas de dosificación farmacéuticas que contienen cantidades eficaces de los mismos y administrarse a seres humanos o animales con fines terapéuticos o diagnósticos. Los péptidos pueden usarse para suprimir los niveles de GH y para tratar estados asociados con niveles excesivos de GH, por ejemplo, retinopatía y nefropatía diabética, y acromegalia. También se proporcionan métodos para tratar estas enfermedades mediante la administración de una composición de la invención a un individuo que necesita tal tratamiento. Los usos principales de antagonistas de GH-RH son, sin embargo, en el campo del cáncer, por ejemplo cánceres humanos de pulmón, próstata, mama, ovario, endometrio, estómago, colon, páncreas, riñón, hueso y cerebro en los que los receptores para GH-RH, IGF-I/IGF-II o GH están presentes, y que dependen de la estimulación mediante factores de crecimiento tales como GH-RH, IGF-I, IGF-II, GH, VEGF o FGF.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

La nomenclatura usada para definir los péptidos es la especificada por la Comisión de nomenclatura bioquímica de la IUPAC-IUB (*IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature*) en la que, según la representación convencional, el grupo amino en el extremo N-terminal aparece a la izquierda y el grupo carboxilo en el extremo C-terminal aparece a la derecha. El término "aminoácido natural" tal como se usa en el presente documento significa uno de los L-aminoácidos comunes, que se producen de manera natural en proteínas que se producen de manera natural: Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, Thr, Lys, Arg, Asp, Asn, Glu, Gln, Cys, Met, Phe, Tyr, Pro, Trp e His. Cuando el residuo de aminoácido natural tiene formas isoméricas, es la forma L del aminoácido la que se representa en el presente documento a menos que se indique expresamente lo contrario.

También se incorporan aminoácidos no codificados o análogos de aminoácido, en los antagonistas de GH-RH. (Aminoácidos "no codificados" son aquellos aminoácidos que no se encuentran entre los aproximadamente 20 aminoácidos naturales encontrados en proteínas que se producen de manera natural). Cuando estos aminoácidos no codificados, o análogos de aminoácido, tienen formas isoméricas, es la forma L del aminoácido la que se representa a menos que se indique expresamente lo contrario.

Abreviaturas

60	Abu	ácido alfa-aminobutírico
	Ac	acetilo
65	AcOH	ácido acético

	Ac ₂ O	anhídrido acético
	Ada	12-aminododecanoílo
5	AE ₂ A	8-amino-3,6-dioxaoctanoílo
	AE ₄ P	15-amino-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoílo
	Agm	agmatina
10	Aha	ácido aminohexanoico
	Amc	8-aminocaprililo
15	Aoc	ácido aminooctanoico
	Apa	5-aminopentanoílo
	Aib	alfa-aminoisobutiroílo
20	All	alilo
	Alloc	aliloxicarbonilo
25	Amp	para-amidino-fenilalanina
	Bpa	para-benzoil-fenilalanina
	Boc	terc-butiloxicarbonilo
30	Bom	benciloximetilo
	2BrZ	2-bromo-benciloxicarbonilo
35	Bzl	bencilo
	Cha	ciclohexilalanina
	Chg	ciclohexilglicina
40	cHx	ciclohexilo
	Cit	citrulina (2-amino-5-ureidovaleroílo)
45	2ClZ	2-cloro-benciloxicarbonilo
	Cpa	para-clorofenilalanina
	Dat	des-amino-tirosina
50	Dca	Dicloroacetilo
	DCM	diclorometano
55	DIC	N,N'-diisopropilcarbodiimida
	DIEA	diisopropiletilamina
	Dip	(3,3-difenil)alanina
60	DMF	dimetilformamida
	Et	etilo
65	Fer	ferulilo

	FGF	factor de crecimiento de fibroblastos
	Fm	fluorenilmetilo
5	Fmoc	fluorenilmetoxycarbonilo
	For	formilo
10	Fpa	Phe mono o polifluorada (sustitución de flúor en el anillo aromático)
	Fpa2	difluoro-Phe
	Fpa3	trifluoro-Phe
15	Fpa4	tetrafluoro-Phe
	Fpa5	pentafluoro-Phe
20	Fpr	fluoropropionilo
	GH	hormona de crecimiento
	GH-RH	hormona liberadora de GH
25	Gup	para-guanidino-fenilalanina
	Har	homoarginina
30	HBTU	hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
	Hca	hidrocinamoílo
	Hca-OH	ácido hidrocinámico
35	hGH-RH	GH-RH humana
	HMBA	4-hidroximetilbenzoílo
40	HOBt	1-hidroxibenzotriazol
	HPLC	cromatografía de líquidos de alta resolución
	Ibu	isobutirilo
45	IndAc	indol-3-acetilo
	Ipa	indol-3-propionilo
50	Lys(0-11)	Lys(A ⁰ -A ¹ -A ² -A ³ -A ⁴ -A ⁵ -A ⁶ -A ⁷ -A ⁸ -A ⁹ -A ¹⁰ -A ¹¹ -)
	ϵ -Lys(a-NH ₂)	un residuo Lys, cuyo grupo ϵ -amino está acilado por el grupo carbonilo de un aminoácido ubicado en el extremo N-terminal; el grupo α -amino del residuo Lys está libre
55	MBHA	para-metilbenzhdrilamina
	Me	metilo
	Me-Ala	N-metil-Ala
60	MeOH	metanol
	MeCN	acetonitrilo
65	Nac	naftilacetilo
	Nal	naftilalanina

	Nle	norleucina
5	NMM	N-metilmorfolina
	Npr	naftilpropionilo
	Oaa	omega-aminoácido
10	Oct	octanoílo
	Orn	ornitina
15	Peg	pegilo
	Pal	piridilalanina
	PAM	enilacetamidometilo
20	Ph	fenilo
	PhAc	fenilacetilo
25	PhAc-OH	ácido fenilacético
	Phe(pCl)	para-cloro-fenilalanina
	Phe(pNH ₂)	para-amino-fenilalanina
30	Phe(pNO ₂)	para-nitro-fenilalanina
	PhPr	fenilpropionilo
35	PhF ₅ Ac	(2,3,4,5,6-pentafluorofenil)-acetilo
	rGH-RH	GH-RH de rata
	RP-HPLC	HPLC de fase inversa
40	Sub	suberilo
	SPA	para-sulfonil-fenoxiacetilo
45	TFA	ácido trifluoroacético
	Tfa	trifluoroacetilo
	Tos	para-toluenosulfonilo
50	Tpi	ácido 1,2,3,4-tetrahidronorharman-3-carboxílico
	Tyr(Me)	O-metil-tirosina
55	Tyr(Et)	O-etil-tirosina
	Z	benciloxicarbonilo

B. Los análogos de GH-RH

60 Los análogos de hGH-RH de la presente invención se diseñaron para aumentar los efectos antagonistas a nivel hipofisiario y/o a nivel tumoral. Se prefieren particularmente los péptidos de la estructura mostrada en la tabla A a continuación:

	TABLA A
P-12640	[PhAc ⁰ -Tyr ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , Fpa ⁵ ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , Abu ¹⁵ , Glu ¹⁷ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹ , Ada ³⁰]hGH-RH(1-30)NH ₂

[illegible]

[illegible]

[illegible]

P-121065	[Dca-Ada ⁰ , Tyr ¹ , D-Arg ² , Fpa5 ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , His ¹⁵ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹ , Agm ³⁰]hGH-RH(1-30)
P-121066	[Dca-Ada ⁰ , Fpa5 ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , His ¹⁵ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹ , Agm ³⁰]hGH-RH(1-30)
P-121067	[Dca-Ada ⁰ , Tyr ¹ , D-Arg ² , Fpa5 ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , Abu ¹⁵ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹ , Agm ³⁰]hGH-RH(1-30)
P-121068	[Dca-Ada ⁰ , Fpa5 ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , Abu ¹⁵ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹ , Agm ³⁰]hGH-RH(1-30)
P-121069	[PhAc-Ada ⁰ , Tyr ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , (3,4-di-fluoro-Phe) ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , His ¹⁵ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹ , Ada ³⁰]hGH-RH(1-30)
P-121070	[PhAc-Ada ⁰ , Tyr ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , (3,4-di-fluoro-Phe) ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , Abu ¹⁵ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹ , Agm ³⁰]hGH-RH(1-30)
P-121071	[CH ₃ (CH ₂) ₁₀ CO-Ada ⁰ , Tyr ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , (3,4-di-fluoro-Phe) ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , His ¹⁵ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹ , Agm ³⁰]hGH-RH(1-30)
P-121072	[CH ₃ (CH ₂) ₁₀ CO-Ada ⁰ , Tyr ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , (3,4-di-fluoro-Phe) ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , Abu ¹⁵ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹ , Agm ³⁰]hGH-RH(1-30)
P-121073	[PhAc-Tyr ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , (3,4-di-fluoro-Phe) ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , His ¹⁵ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹ , Agm ³⁰]hGH-RH(1-30)
P-121074	[PhAc-Ada ⁰ , Tyr ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , (3,4-di-fluoro-Phe) ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , His ¹⁵ , Glu ¹⁷ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹ , Agm ³⁰]hGH-RH(1-30)
P-121075	[PhAc-Ada ⁰ , Tyr ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , (3,4-di-fluoro-Phe) ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , Abu ¹⁵ , Glu ¹⁷ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹ , Agm ³⁰]hGH-RH(1-30)
P-121101	[PhAc-Ada ⁰ , Tyr ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , His ¹⁵ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹]hGH-RH(1-29)NH ₂
P-121102	[PhAc-Ada ⁰ , Tyr ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , (3,4,5-tri-fluoro-Phe) ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , His ¹⁵ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹]hGH-RH(1-29)NH ₂
P-121103	[PhAc-Ada ⁰ , Tyr ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , Abu ¹⁵ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹]hGH-RH(1-29)NH ₂
P-121104	[PhAc-Ada ⁰ , Tyr ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , (3,4,5-tri-fluoro-Phe) ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , Abu ¹⁵ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹]hGH-RH(1-29)NH ₂
P-121105	[PhAc-Ada ⁰ , Tyr ¹ , D-Arg ² , Fpa5 ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , His ¹⁵ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹]hGH-RH(1-29)NH ₂
P-121106	[PhAc-Ada ⁰ , Fpa5 ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , His ¹⁵ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹]hGH-RH(1-29)NH ₂
P-121107	[PhAc-Ada ⁰ , Tyr ¹ , D-Arg ² , Fpa5 ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , Abu ¹⁵ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹]hGH-RH(1-29)NH ₂
P-121108	[PhAc-Ada ⁰ , Fpa5 ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , Abu ¹⁵ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹]hGH-RH(1-29)NH ₂
P-121109	[CH ₃ (CH ₂) ₁₀ CO-Ada ⁰ , Tyr ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , His ¹⁵ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹]hGH-RH(1-29)NH ₂
P-121110	[CH ₃ (CH ₂) ₁₀ CO-Ada ⁰ , Tyr ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , (3,4,5-tri-fluoro-Phe) ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , His ¹⁵ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹]hGH-RH(1-29)NH ₂
P-121111	[CH ₃ (CH ₂) ₁₀ CO-Ada ⁰ , Tyr ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , Abu ¹⁵ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹]hGH-RH(1-29)NH ₂
P-121112	[CH ₃ (CH ₂) ₁₀ CO-Ada ⁰ , Tyr ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , (3,4,5-tri-fluoro-Phe) ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , Abu ¹⁵ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹]hGH-RH(1-29)NH ₂
P-121113	[CH ₃ (CH ₂) ₁₀ CO-Ada ⁰ , Tyr ¹ , D-Arg ² , Fpa5 ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , His ¹⁵ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹]hGH-RH(1-29)NH ₂
P-121114	[CH ₃ (CH ₂) ₁₀ CO-Ada ⁰ , Fpa5 ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , His ¹⁵ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹]hGH-RH(1-29)NH ₂
P-121115	[CH ₃ (CH ₂) ₁₀ CO-Ada ⁰ , Tyr ¹ , D-Arg ² , Fpa5 ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , Abu ¹⁵ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹]hGH-RH(1-29)NH ₂
P-121116	[CH ₃ (CH ₂) ₁₀ CO-Ada ⁰ , Fpa5 ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , Abu ¹⁵ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹]hGH-RH(1-29)NH ₂
P-121117	[Ac-Ada ⁰ , Tyr ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , His ¹⁵ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹]hGH-RH(1-29)NH ₂
P-121118	[Ac-Ada ⁰ , Tyr ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , (3,4,5-tri-fluoro-Phe) ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , His ¹⁵ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹]hGH-RH(1-29)NH ₂
P-121119	[Ac-Ada ⁰ , Tyr ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , Abu ¹⁵ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹]hGH-RH(1-29)NH ₂
P-121120	[Ac-Ada ⁰ , Tyr ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , (3,4,5-tri-fluoro-Phe) ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , Abu ¹⁵ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹]hGH-RH(1-29)NH ₂
P-121121	[Ac-Ada ⁰ , Tyr ¹ , D-Arg ² , Fpa5 ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , His ¹⁵ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹]hGH-RH(1-29)NH ₂

[illegible]

[illegible]

[illegible]

P-12640	[PhAc ⁰ -Tyr ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , Abu ¹⁵ , Glu ¹⁷ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹ , Ada ³⁰]hGH-RH(1-30)NH ₂
P-12690	[(PhAc-Ada) ⁰ -Tyr ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , Abu ¹⁵ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹]hGH-RH(1-29)NH ₂
P-12880	[(PhAc-Ada) ⁰ -Fpa5 ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , His ¹⁵ , Glu ¹⁷ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹]hGH-RH(1-29)NH ₂
P-121001	[PhAc-Ada ⁰ , Tyr ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , His ¹⁵ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹ , Agm ³⁰]hGH-RH(1-30)
P-121005	[PhAc-Ada ⁰ , Tyr ¹ , D-Arg ² , Fpa5 ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , His ¹⁵ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹ , Agm ³⁰]hGH-RH(1-30)
P-121101	[PhAc-Ada ⁰ , Tyr ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , His ¹⁵ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹]hGH-RH(1-29)NH ₂

C. Método de preparación

Vista general de la síntesis

- 5 Los péptidos se sintetizan mediante métodos adecuados tales como mediante técnicas en fase sólida exclusiva, mediante técnicas en fase sólida parcial, mediante condensación de fragmentos o mediante síntesis en fase de disolución clásica. Por ejemplo, las técnicas de síntesis en fase sólida exclusiva se exponen en el manual "Solid Phase Peptide Synthesis", J.M. Stewart y J.D. Young, Pierce Chem. Company, Rockford, Illinois, 1984 (2ª. ed.), y M. Bodanszky, "Principles of Peptide Synthesis", Springer Verlag, 1984. Los péptidos antagonistas de hGH-RH se preparan preferiblemente usando síntesis en fase sólida, tal como la descrita de manera general por Merrifield, J.Am.Chem.Soc., 85 pág. 2149 (1963), aunque también pueden usarse otras síntesis químicas equivalentes conocidas en la técnica tal como se mencionó anteriormente.
- 10 La síntesis se lleva a cabo con aminoácidos que se protegen en su grupo amino alfa. Se usan preferiblemente los grupos protectores de tipo uretano (Boc o Fmoc) para la protección del grupo amino alfa. En determinados casos, también se usan omega-aminoácidos protegidos durante la síntesis. Los grupos protectores Boc y Fmoc también son apropiados para la protección de grupos amino omega.
- 15 En la síntesis en fase sólida, el resto de aminoácido protegido en N-alfa o protegido en N-omega que forma el grupo aminoacilo del péptido final en el extremo C-terminal se une a un soporte de resina polimérica mediante un enlace químico. Tras completarse la reacción de acoplamiento, el grupo protector de amino alfa (u omega) se retira de manera selectiva para permitir que tengan lugar reacciones de acoplamiento posteriores en el extremo amino-terminal, preferiblemente con TFA al 50% en DCM cuando el grupo protector de N-alfa- (N-omega-) es Boc, o mediante piperidina al 20% en DMF cuando el grupo protector de N-alfa- (N-omega-) es Fmoc. Los aminoácidos restantes en la secuencia con grupos amino alfa (u omega) protegidos con Boc o Fmoc de manera similar se acoplan gradualmente al grupo amino libre del aminoácido anterior en la resina para obtener la secuencia peptídica deseada. Debido a que los residuos de aminoácido se acoplan al grupo amino alfa (u omega) del residuo del extremo C-terminal, el crecimiento de los péptidos análogos de hGH-RH sintéticos comienza en el extremo C-terminal y avanza hacia el extremo N-terminal. Cuando se ha obtenido la secuencia deseada, el péptido se acila en el extremo N-terminal, y se retira del polímero de soporte.
- 20 Cada aminoácido protegido se usa en exceso (2,5 ó 3 equivalentes) y las reacciones de acoplamiento se llevan a cabo habitualmente en DCM, DMF o mezclas de los mismos. El grado de finalización de la reacción de acoplamiento se monitoriza en cada fase mediante la reacción de ninhidrina. En los casos en que se determina acoplamiento incompleto, se repite el procedimiento de acoplamiento, o se lleva a cabo una ocupación mediante acetilación de grupos amino que no han reaccionado, antes de retirar el grupo protector de amino alfa (u omega) antes del acoplamiento del siguiente aminoácido.
- 25 Los ciclos de síntesis típicos se muestran en la tabla I y la tabla II.

TABLA I.

Protocolo para un ciclo de síntesis típico usando la estrategia de Boc

Etapa	Reactivo	Tiempo de mezclado (min)
1. Desprotección	TFA al 50% en DCM	5+25
	lavado con DCM	1
	lavado con 2-propanol	1
2. Neutralización	DIEA al 5% en DCM	1
	lavado con DCM	1
	lavado con MeOH	1
	DIEA al 5% en DCM	3

	lavado con MeOH	1
	lavado con DCM (3 veces)	1
3. Acoplamiento	3 eq. de Boc-aminoácido en DCM o DMF + 3 eq. de DIC o el éster de HOBt preformado del Boc-aminoácido	90
	lavado con MeOH (3 veces)	1
	lavado con DCM (3 veces)	1
4. Acetilación (si resulta apropiado)	Ac ₂ O en piridina (30%)	10+20
	lavado con MeOH (3 veces)	1
	lavado con DCM (3 veces)	1

TABLA II.

Protocolo para un ciclo de síntesis típico usando la estrategia de Fmoc		
Etapas	Reactivo	Tiempo de mezclado (min)
1. Desprotección	piperidina al 20% en DMF lavado con DMF (3 veces)	5+15 1
2. Acoplamiento	3 eq. de Fmoc-aminoácido en DMF +3 eq. de DIC o +3 eq. de HBTU + 3 eq. de HBTU + 6 eq. de DIEA lavado con DMF (3 veces)	90 1
3. Acetilación (si resulta apropiado)	3 eq. de 1-acetilimidazol en DMF lavado con DMF (3 veces)	30 1

- 5 Tras completarse la síntesis, puede efectuarse la escisión del péptido de la resina usando procedimientos bien conocidos en la química de péptidos.

2. Elección del polímero de soporte.

- 10 Los péptidos antagonistas de hGH-RH pueden sintetizarse en una variedad de polímeros de soporte, es decir resinas de MBHA, Merrifield, PAM, amida de Rink o Wang. Los péptidos también pueden sintetizarse en aminometilo, MBHA u otras resinas que se han derivatizado previamente con ligadores adecuados. Ejemplos de tales ligadores son el ligador ácido 4-hidroximetilbenzoico (HMBA) lábil frente a bases para la unión de grupos carboxilo C-terminales o el ligador para-sulfonil-fenoxiacetilo (SPA) lábil frente a ácidos que permite la unión de
- 15 agmatina a través de su grupo guanidino.

Cuando se sintetizan péptidos con un extremo C-terminal amidado usando la estrategia de Boc, la resina preferida es MBHA. La unión del aminoácido C-terminal a esta resina puede lograrse mediante el método de acoplamiento mediado por DIC convencional descrito en la tabla I.

Con el fin de preparar péptidos con una modificación de etilamida (-NH₂) C-terminal, puede usarse la resina de Merrifield o la resina de HMBA-MBHA conjuntamente con la estrategia de Boc. La carga del aminoácido C-terminal sobre la resina de Merrifield se realiza mediante acoplamiento mediado por fluoruro de potasio (KF) o sal de cesio a temperatura elevada.

Para la síntesis de péptidos que tienen Agm en el extremo C-terminal, se prefiere que la fase de soporte sea resina de MBHA o una resina de aminometilo. El grupo guanidino de Boc-Agm se une al polímero de soporte a través de un ligador estable, pero que puede escindirse fácilmente tal como el resto para-sulfonil-fenoxiacetilo (SPA). El Agm protegido con alfa-amino-Boc se hace reaccionar el ácido clorosulfonilfenoxiacético Cl-SO₂-C₆H₄-O-CH₂-COOH para formar Boc-Agm-SO₂-C₆H₄-OCH₂-COOH. Este compuesto se acopla entonces al polímero de soporte, por ejemplo a resina de MBHA, usando DIC o HBTU-HOBt-DIEA como reactivo de activación para proporcionar Boc-Agm-SPA-MBHA.

3. Derivados de aminoácido usados.

Los aminoácidos bifuncionales, es decir aquéllos que no tienen grupos funcionales de cadena lateral, se usan principalmente en forma de sus derivados de N-alfa Boc o Fmoc para la síntesis. Los omega-aminoácidos bifuncionales también se usan normalmente en forma de sus derivados de N-omega Boc o Fmoc.

Por tanto, se usa normalmente Boc-Ala-OH o Fmoc-Ala-OH para incorporar el residuo. Los α-aminoácidos bifuncionales que se producen de manera natural son Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe y Pro, y algunos aminoácidos

bifuncionales no codificados bien conocidos usados en esta invención son Abu, Aib y Nle.

Algunos de los residuos de aminoácido de los péptidos tienen grupos funcionales de cadena lateral que son reactivos con los reactivos usados en el acoplamiento o la desprotección. Cuando están presentes tales grupos de cadena lateral, se unen grupos protectores adecuados a estos grupos funcionales para evitar que se produzcan reacciones químicas no deseadas durante las reacciones usadas para formar los péptidos. Se siguen las siguientes reglas generales en la selección de un grupo protector de cadena lateral particular: (a) el grupo protector conserva preferiblemente sus propiedades protectoras y no se separa en condiciones de acoplamiento, (b) el grupo protector debe ser estable en condiciones para retirar el grupo protector de amino alfa en cada etapa de la síntesis, (c) el grupo protector de cadena lateral debe poder retirarse tras completarse la síntesis de la secuencia de aminoácidos deseada, en condiciones de reacción que no alterarán de manera indeseable la cadena peptídica.

Cuando se usan Boc-aminoácidos en la síntesis, pueden protegerse los grupos funcionales de cadena lateral reactivos tal como sigue: Tos o nitro (NO₂) para Arg y Har; cHx o Fm para Asp y Glu; Bom para His; 2ClZ o Fmoc para Lys y Orn; Bzl para Ser y Thr; y 2BrZ para Tyr. Las cadenas laterales de Asn y Gln no se protegen. En el caso de la síntesis con Fmoc, pueden protegerse los grupos funcionales de cadena lateral reactivos mediante otros grupos protectores apropiados tal como sigue: 2,2,4,6,7-pentametil-dihidrobenzofuran-5-sulfonilo (Pbf) o bis-Boc para Arg y Har; terc-butilo (tBu) para Asp y Glu; sin grupo protector o protección con tritilo (Trt) para Asn y Gln; Trt para His; Boc o 4-metoxitritilo (Mmt) para Lys y Orn; tBu o Trt para Ser y Thr; y tBu o 2-clorotritilo (2ClTrt) para Tyr.

Además de los aminoácidos codificados y no codificados ampliamente conocidos mencionados anteriormente, algunos de los péptidos de esta solicitud contienen aminoácidos no codificados menos comunes tales como para-amidino-fenilalanina (Amp); para-guanidino-fenilalanina (Gup); ácido 1,2,3,4-tetrahidronorharman-3-carboxílico (Tpi); (2-naftil)alanina (2-Nal); (3,3-difenil)alanina (Dip); para-amino-fenilalanina [Phe(pNH₂)]; para-nitro-fenilalanina [Phe(pNO₂)]; (3-piridil)alanina (3-Pal); O-etil-tirosina [Tyr(Et)]; y Phe mono, di o polifluorada (Fpa, Fpa2, Fpa3, Fpa4, Fpa5). Estos residuos de aminoácido se incorporan en los péptidos mediante acoplamiento de los derivados de aminoácido protegidos adecuados. Una lista no excluyente de tales derivados de aminoácido protegidos que pueden usarse es tal como sigue: Boc-Amp(Alloc)-OH, Boc-Amp-OH, Fmoc-Amp(Alloc)-OH, Fmoc-Amp-OH, Boc-Gup(Tos)-OH, Boc-Gup-OH, Fmoc-Gup(Boc)₂-OH, Fmoc-Gup-OH, Boc-Cha-OH, Boc-Tpi-OH, Boc-2-Nal-OH, Boc-Dip-OH, Boc-Phe(pNH-Z)-OH, Boc-Phe(pNO₂)-OH, Boc-3-Pal-OH, Boc-Tyr(Et)-OH, Boc-Bpa-OH, Boc-3,4-di-fluoro-fenilalanina, Boc-3,4,5-tri-fluoro-fenilalanina, Boc-Fpa-OH, Boc-Fpa2-OH, Boc-Fpa3-OH, Boc-Fpa4-OH, Boc-Fpa5-OH. La mayoría de los derivados protegidos de aminoácidos no codificados mencionados anteriormente están disponibles comúnmente de varios proveedores comerciales, incluyendo Bachem (King of Prussia, PA), Peptides International (Louisville, KY), Novabiochem (San Diego, CA), Advanced ChemTech (Louisville, KY), RSP Aminoacid Analogues DBA (Worcester, MA) y AnaSpec (San Jose, CA).

4. Acoplamiento gradual de residuos de aminoácido

Utilizando los polímeros de soporte mencionados anteriormente y tras cargar el aminoácido C-terminal o el residuo de Agm, el propio péptido puede construirse de manera adecuada mediante síntesis en fase sólida de manera convencional. Cada aminoácido protegido se acopla en aproximadamente un exceso molar de tres veces, con respecto a residuos de amino libres unidos a resina, y el acoplamiento puede llevarse a cabo en un medio tal como DMF-DCM (1:1) o en DMF o DCM solo. La selección de un reactivo de acoplamiento apropiado se encuentra dentro de la capacidad del experto de la técnica. Particularmente adecuados como reactivos de acoplamiento son N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC), o HBTU combinado con HOBt en presencia de DIEA. Preferiblemente se monitoriza el éxito de la reacción de acoplamiento en cada fase de la síntesis mediante la reacción de ninhidrina. En los casos en que se produce un acoplamiento incompleto, o bien se repite el procedimiento de acoplamiento, o bien se acetilan los residuos de amino que no han reaccionado unidos a la resina usando un reactivo de ocupación, antes de retirar el grupo protector de amino alfa (u omega). Los reactivos de ocupación adecuados son 1-acetilimidazol y Ac₂O-piridina.

La acilación final del extremo N-terminal del péptido con ácidos monocarboxílicos se realiza de la misma manera que los acoplamientos anteriores, con la diferencia de que se usa ácido carboxílico apropiado en lugar de un aminoácido. Cuando se unen ácidos dicarboxílicos al extremo N-terminal y se desea que reaccione sólo un grupo -COOH con el extremo amino-terminal del péptido (es decir, se preparan monoamidas de estos ácidos), pueden usarse los anhídridos de los respectivos ácidos dicarboxílicos para el acoplamiento. Los anhídridos cíclicos de muchos ácidos dicarboxílicos están disponibles comercialmente; en otros casos, los anhídridos preformados de estos ácidos se preparan mediante tratamiento con DIC y se usan para el acoplamiento.

5. Escisión del péptido del polímero de soporte y retirada de los grupos protectores de cadena lateral

Cuando la síntesis está completa, se escinde el péptido de la fase de soporte y se retiran sus grupos protectores de cadena lateral.

En los casos en que se preparan péptidos con un extremo C-terminal amidado (-CONH₂) o con un grupo carboxilo (-COOH) C-terminal mediante la estrategia de Boc en una resina de MBHA, Merrifield o PAM, la retirada del péptido

de la resina se realiza mediante tratamiento con un reactivo tal como fluoruro de hidrógeno (HF) líquido. Este también es el caso para péptidos sintetizados en la resina de Boc-Agm-SPA-MBHA. En algunos casos, el HF líquido también escinde todos los grupos protectores de cadena lateral restantes. Sin embargo, si están presentes grupos protectores de cadena lateral resistentes a tratamiento con HF en el péptido, deben realizarse etapas de escisión adicionales con el fin de retirar estos grupos protectores. Por tanto, los grupos protectores Fm y Fmoc se retiran mediante tratamiento con piperidina al 20% en DMF, mientras que los grupos All y Alloc se retiran mediante tratamiento con catalizador Pd(PPh₃)₄ y eliminadores nucleófilos, antes de o tras el tratamiento con HF.

De manera adecuada, el péptido-resina seco y protegido se trata con una mezcla que consiste en 1,0 ml de m-cresol y 10 ml de fluoruro de hidrógeno anhidro por gramo de péptido-resina durante 60-120 min a 0°C para escindir el péptido de la resina así como para retirar los grupos protectores de cadena lateral lábiles frente a HF. Tras retirar el fluoruro de hidrógeno bajo una corriente de nitrógeno y vacío, se precipitan los péptidos libres con éter, se filtran, se lavan con éter y acetato de etilo, se extraen con ácido acético al 50% y se liofilizan.

En los casos en que los se preparan péptidos con un extremo C-terminal de etilamida (-NH₂) mediante la estrategia de Boc en la resina de Merrifield o HMBA-MBHA, en primer lugar se escinden los péptidos protegidos de la resina mediante aminólisis mediada por etilamina (EtNH₂). De manera adecuada, se transfiere EtNH₂ líquida a un matraz de vidrio de paredes pesadas que contiene el péptido-resina seco y protegido. La cantidad de EtNH₂ líquida debe ser suficiente para cubrir el péptido-resina. Se tapa el matraz, y se agita con la EtNH₂ líquida durante 3,5 horas a temperatura ambiente con el fin de permitir que la reacción tenga lugar. Tras esto, se enfría el matraz en un baño de nieve carbónica, se abre y se separa por filtración la EtNH₂ líquida del residuo sólido que contiene una mezcla de resina y péptido escindido, teniendo el péptido todavía los grupos protectores unidos. Se seca el residuo sólido y se somete a tratamiento con HF tal como se describió anteriormente, con el fin de retirar los grupos protectores de cadena lateral del péptido.

6. Purificación.

Puede efectuarse la purificación de los péptidos brutos usando procedimientos bien conocidos en la química de péptidos. Por ejemplo, puede realizarse la purificación en un sistema de HPLC MacRabbit (Rainin Instrument Co. Inc., Woburn, MA) con un fotómetro de UV Knauer y un registrador BD40 de Kipp y Zonen usando una columna de fase inversa Vydac 218TP510 (10 x 250 mm, rellena con gel de sílice C18, tamaño de poro de 300 Å, tamaño de partícula de 5 µm) (The Separations Group Inc., Hesperia, CA). Se eluye la columna con un sistema de disolventes que consiste en (A) el TFA al 0,1% acuoso y (B) el TFA al 0,1% en el MeCN al 70% acuoso en un modo de gradiente lineal (por ejemplo, el 30-55% de B en 120 min). Se monitoriza el eluyente a 220 nm y se examinan las fracciones mediante HPLC analítica usando un cromatógrafo de líquidos de Hewlett-Packard modelo HP-1090 y se combinan para dar la pureza máxima. Se lleva a cabo HPLC analítica en una columna de fase inversa Vydac 218TP52 (2 x 250 mm, C18, 300 Å, 5 µm) usando elución isocrática con un sistema de disolventes que consiste en (A) y (B) definidos anteriormente. Se monitorizan los picos a 220 y 280 nm. Se considera que los péptidos son sustancialmente puros (>95%) mediante HPLC analítica. Se comprueban las masas moleculares mediante espectrometría de masas por electropulverización y se confirman las composiciones de aminoácido esperadas mediante análisis de aminoácidos.

D. Composiciones farmacéuticas y modo de administración.

Los péptidos de la invención pueden administrarse en forma de sales no tóxicas, farmacéuticamente aceptables, tales como sales de adición de ácido. Ejemplos de tales sales de adición ácido son clorhidrato, bromhidrato, sulfato, fosfato, fumarato, gluconato, tanato, maleato, acetato, trifluoroacetato, citrato, benzoato, succinato, alginato, pamoato, malato, ascorbato, tartarato, y similares. Antagonistas particularmente preferidos son sales de solubilidad baja, por ejemplo, sales de pamoato y similares. Éstas presentan duración larga de actividad.

Los compuestos de la presente invención se administran de manera adecuada a sujetos humanos o animales por vía subcutánea (s.c.), por vía intramuscular (i.m.) o por vía intravenosa (i.v.); por vía intranasal o mediante inhalación pulmonar; mediante administración transdérmica; o en forma de depósito (por ejemplo, microcápsulas, microgránulos o implantes similares a varillas) formulados a partir de un polímero adecuado biodegradable (tal como D,L-lactida-coglicolida), prefiriéndose los dos primeros modos de depósito. Otros modos de administración equivalentes también se encuentran dentro del alcance de esta invención, es decir, goteo continuo, parches cutáneos, inyecciones en depósito, bomba de infusión y modos de liberación temporal tales como microcápsulas y similares. La administración se realiza en cualquier portador inyectable fisiológicamente aceptable, siendo aceptable solución salina fisiológica, aunque también pueden usarse otros portadores conocidos en la técnica.

Los péptidos se administran preferiblemente por vía parenteral, por vía intramuscular, por vía subcutánea o por vía intravenosa con un portador farmacéuticamente aceptable tal como solución salina isotónica. Alternativamente, los péptidos pueden administrarse como una pulverización intranasal con un portador apropiado o mediante inhalación pulmonar. Una vía de administración adecuada es una forma de depósito formulada a partir un polímero adecuado biodegradable, por ejemplo, poli-D,L-lactida-coglicolida como microcápsulas, microgránulos o implantes cilíndricos que contienen compuestos antagonistas dispersos.

La cantidad de péptido necesaria depende del tipo de composición farmacéutica y del modo de administración. En los casos en que sujetos humanos reciben disoluciones de antagonistas de GH-RH, administradas mediante inyección por vía i.m. o s.c., o en forma de pulverización intranasal o inhalación pulmonar, las dosis típicas son entre 2-20 mg/día/paciente, administradas una vez al día o divididas en 2-4 administraciones/día. Cuando se administran los antagonistas de GH-RH por vía intravenosa a pacientes humanos, las dosis típicas están en el intervalo de 8-80 µg/kg de peso corporal/día, divididas en 1-4 inyecciones en bolo/día o se administran como infusión continua. Cuando se usan las preparaciones en depósito de los antagonistas de GH-RH, por ejemplo mediante inyección i.m. de sales de pamoato u otras sales de solubilidad baja, o mediante administración por vía i.m. o s.c. de microcápsulas, microgránulos o implantes que contienen los compuestos antagonistas dispersos en un polímero biodegradable, las dosis típicas son entre 1-10 mg antagonista/día/paciente.

E. Usos terapéuticos de antagonistas de GH-RH.

Se espera que las aplicaciones terapéuticas más importantes de antagonistas de GH-RH sean en el campo de la oncología y la endocrinología. Algunos de los antagonistas de GH-RH actúan predominantemente a nivel de la hipófisis y tienen efectos endocrinos más fuertes, inhibiendo la liberación de GH provocada por GH-RH, y en última instancia disminuyendo los niveles en suero de GH e IGF-I. Otros antagonistas de GH-RH actúan predominantemente a nivel tumoral, bloqueando los receptores tumorales para GH-RH, reduciendo la producción de diversos factores de crecimiento tumoral autocrinos/paracrinos (tales como IGF-I, IGF-II, GH, VEGF, FGF) y/o regulando por disminución sus receptores (receptores de IGF-I, receptores de GH, receptores de VEGF, receptores de FGF, receptores EGFR de EGF, receptores HER2, HER3 y HER4 de factor de crecimiento epidérmico humano), además de inhibir las rutas de señalización intracelulares implicadas en la proliferación y la supervivencia de las células de cáncer, y por tanto ejercen efectos inhibidores más fuertes sobre el crecimiento tumoral. Estos antagonistas también pueden usarse como sistemas portadores unidos a radionúclidos para la localización o terapia tumoral, o conjugados con toxinas o agentes quimioterápicos. Tales compuestos híbridos pueden dirigirse de manera activa frente a cáncer para fines diagnósticos o terapéuticos. Aún otros antagonistas de GH-RH actúan mediante múltiples mecanismos de acción, es decir mediante mecanismos endocrinos y mediante efectos directos sobre tumores al mismo tiempo. Por tanto, las indicaciones terapéuticas principales de diversos antagonistas de GH-RH difieren basándose en sus mecanismos de acción preferidos.

Pueden usarse análogos de GH-RH con acción antagonista sobre la hipófisis en situaciones en las que es beneficioso suprimir los niveles en suero de GH e IGF-I. Por tanto están indicados para la terapia de trastornos endocrinos caracterizados por la producción excesiva de GH e IGF-I, así como para el tratamiento de cánceres que expresan receptores para IGF-I, IGFII o GH, y cuya proliferación de está estimulada por estos factores de crecimiento.

También están disponibles análogos de somatostatina y antagonistas de GH para el tratamiento de estados endocrinos provocados por GH e IGF-I. Sin embargo, los antagonistas de GH-RH ofrecen beneficios terapéuticos únicos que no pueden obtenerse mediante el uso de análogos de somatostatina y antagonistas de GH.

Estos beneficios se deben a los múltiples mecanismos de acción de los antagonistas de GH-RH, concretamente que ejercen efectos directos independientes de GH e IGF-I sobre tumores y otros sitios diana, además de inhibir el eje endocrino para GH e IGF-I. Los antagonistas de GH-RH pueden administrarse solos o junto con análogos de somatostatina, una combinación que suprime de manera más completa los niveles de GH e IGF-I. Un efecto secundario no deseado de los antagonistas de GH, que puede evitarse mediante la administración de antagonistas de GH-RH, es la elevación de niveles de GH en suero a través de un mecanismo de retroalimentación.

Una enfermedad provocada por exceso de hormona de crecimiento es acromegalia, que se manifiesta con un agrandamiento anómalo de los huesos de la cara y las extremidades. Los antagonistas de GH-RH podrían aliviar las manifestaciones clínicas de acromegalia, por ejemplo el agrandamiento de los huesos faciales y de las extremidades, el agrandamiento del corazón y otras anomalías estructurales y funcionales del sistema cardiovascular. Los antagonistas de GH-RH también pueden usarse para tratar retinopatía diabética (la causa principal de ceguera en diabéticos) y nefropatía diabética, en las que se cree que el daño al ojo y al riñón, respectivamente, se debe a GH. Los pacientes diabéticos también pueden beneficiarse del aumento de la sensibilidad a la insulina producido por antagonistas de GH-RH, un efecto ligado a la capacidad de estos compuestos para reducir los niveles de GH e IGF-I. Además, puesto que inhiben la liberación de GH, los antagonistas de GH-RH pueden usarse para ralentizar el avance de la distrofia muscular.

Los fármacos con propiedades anti-factor de crecimiento tales como los antagonistas de GH-RH también pueden ser beneficiosos controlando o ralentizando el avance de algunos procesos clinicopatológicos en estados tales como enfermedades autoinmunitarias incluyendo esclerosis múltiple, así como fibrosis pulmonar idiopática, esclerosis sistémica y cardiomiopatía hipertrófica, en las que las presentes terapias médicas tienen relativamente poco que ofrecer.

Los antagonistas de GH-RH pueden administrarse para disminuir la aparición de reestenosis de diversos vasos y

endoprótesis y dispositivos sintéticos tales como endoprótesis en angioplastia coronaria transluminal percutánea (PTCA). Esta disminución se logra administrando a dicho paciente una cantidad eficaz de un antagonista de GH-RH adecuado tal como el compuesto según la reivindicación 1 suficiente para producir tal disminución. La reestenosis puede producirse como resultado de muchos estados.

De particular interés es el provocado por la inserción previa de un dispositivo terapéuticamente eficaz en una ubicación apropiada en el paciente, por ejemplo cuando el dispositivo es una endoprótesis, en particular cuando la endoprótesis es una endoprótesis sintética, especialmente cuando la endoprótesis se inserta como parte del procedimiento de angioplastia percutánea. El método se emplea de manera útil cuando se produce reestenosis durante la diálisis de un paciente, administrándose en tal caso el compuesto en el líquido de diálisis. La incorporación de antagonistas de GH-RH al interior o sobre las superficies de tales dispositivos también se encuentra dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, el compuesto puede recubrirse sobre la superficie del dispositivo o incorporarse en el interior del dispositivo.

Algunos estados ginecológicos, tales como mioma, endometriosis y síndrome del ovario poliquístico, también pueden tratarse con antagonistas de GH-RH en combinación con agonistas o antagonistas de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LH-RH). Los antagonistas de GH-RH también están disponibles para el tratamiento de la hiperplasia prostática benigna (BPH) y trastornos proliferativos hiperplásicos y benignos de otros órganos normales en los que están presentes los receptores de GH-RH.

Sin embargo, las aplicaciones principales de los antagonistas de GH-RH se encuentran en el campo del cáncer. Los antagonistas de GH-RH, especialmente aquéllos con efectos directos fuertes a nivel tumoral, están indicados para la inhibición del crecimiento de tumores primarios y para la supresión de su propagación metastásica. Puesto que los efectos antiproliferativos de los antagonistas de GH-RH se ejercen mediante varios mecanismos, estos compuestos están disponibles para el tratamiento de una gran variedad de cánceres, tales como los que dependen de la estimulación autocrina/paracrina y endocrina mediante GH-RH, IGF-I, IGF-II, GH, VEGF y FGF, y cánceres que dependen de receptores de factor de crecimiento tales como receptores de GH-RH, receptores de IGF-I, receptores de GH, receptores de VEGF, receptores de FGF y receptores de la familia de receptor EGF/HER (receptores de EGF o HER1, HER2, HER3 y HER4). Los antagonistas de GH-RH también inhiben la fosforilación de las MAP cinasas ERK_{1/2}, c-jun cinasa JNK, y la fosforilación de AKT, y por tanto están disponibles para el tratamiento de cánceres que dependen de las rutas de señalización de MEK-ERK y PI3K-AKT-mTOR. Además, los antagonistas de GH-RH disminuyen los niveles de ciclooxigenasa 2 (COX2), y proteínas Ras mutantes. Por tanto, los antagonistas de GH-RH también están disponibles para el tratamiento de cánceres que dependen de las rutas de señalización proliferativas y anti-apoptóticas (de supervivencia), moléculas de señalización y oncoproteínas mencionadas. Para beneficios terapéuticos máximos, los antagonistas de GH-RH están disponibles para su uso como agentes terapéuticos únicos, o en regímenes terapéuticos de combinación con agentes quimioterápicos y citotóxicos, agentes terapéuticos dirigidos y radioterapia.

Los antagonistas de GH-RH están disponibles para el tratamiento de tumores que expresan receptores de GH-RH y usan GH-RH como factor de crecimiento autocrino/paracrina. Tales tumores malignos incluyen, pero no se limitan a, cánceres de pulmón, próstata, mama, ovario, endometrio, esófago, estómago, intestino, páncreas, riñón, vejiga urinaria, hueso, hígado, así como glioblastomas, feocromocitomas, melanomas y linfomas. Bloqueando los receptores tumorales para GH-RH, estos antagonistas evitan la acción estimuladora de GH-RH, dando como resultado la inhibición del crecimiento tumoral.

Una ventaja de los antagonistas de GH-RH con respecto a los análogos de somatostatina se basa en el hecho de que los antagonistas de GH-RH pueden utilizarse para la supresión de tumores que no tienen receptores de somatostatina pero que expresan los receptores tumorales para GH-RH, por ejemplo sarcomas osteogénicos humanos.

Los tumores malignos que expresan los receptores de IGF-I, y dependen de IGF-I y/o IGF-II como factores de crecimiento, están disponibles para la terapia con antagonistas de GH-RH. Estos tumores malignos incluyen, entre otros, cánceres de pulmón, prostáticos, de mama, ováricos, endometriales, gástricos, colorrectales, pancreáticos, renales y cánceres hepáticos, sarcomas y tumores cerebrales. La capacidad de los antagonistas de GH-RH para disminuir los niveles de IGF-I en suero, inhibir la producción autocrina/paracrina de IGF-I y/o IGF-II en el tejido tumoral, y regular por disminución el nivel de expresión de receptor de IGF-I, es beneficiosa para la terapia contra el cáncer.

Los cánceres de mama y otros tipos de cáncer que dependen de GH como factor de crecimiento, pueden tratarse con antagonistas de GH-RH. La capacidad de los antagonistas de GH-RH para reducir los niveles en suero de GH, inhibir la producción autocrina de GH y regular por disminución la expresión del receptor de GH, beneficia al tratamiento de determinados cánceres de mama y también de otros tipos de tumores.

Los antagonistas de GH-RH están disponibles como inhibidores de la angiogénesis, en vista de su actividad inhibidora sobre la síntesis de VEGF, bFGF y sus receptores (receptores para VEGF y bFGF) por tejidos tumorales y células endoteliales normales, y considerando su efecto antiproliferativo sobre células endoteliales. Por tanto, los

antagonistas de GH-RH podrían ser beneficiosos para el tratamiento de aquellos tumores que dependen fuertemente de VEGF, bFGF y neoangiogénesis.

Ejemplos

En los ejemplos, se usan aminoácidos protegidos ópticamente activos en la configuración L excepto cuando se indique específicamente.

Los siguientes ejemplos exponen métodos adecuados de síntesis de los antagonistas de GH-RH novedosos mediante la técnica en fase sólida.

EJEMPLO I

PhAc⁰-Tyr¹-D-Arg²-Asp³-Ala⁴-Ile⁵-Cpa⁶-Trh⁷-Ala⁸-Har⁹-Fpa⁵¹⁰-His¹¹-Orn¹²-Val¹³-Leu¹⁴-Abu¹⁵-Gln¹⁶-Glu¹⁷-Ser¹⁸-Ala¹⁹-His²⁰-Orn²¹-Leu²²-Leu²³-Gln²⁴-Asp²⁵-Ile²⁶-Nle²⁷-D-Arg²⁸-Har²⁹-Ada³⁰-NH₂ (Péptido 12640)

[PhAc⁰-Tyr¹, D-Arg², Cpa⁶, Ala⁸, Har⁹, Fpa⁵¹⁰, His¹¹, Orn¹², Abu¹⁵, Glu¹⁷, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹, Ada³⁰]hGH-RH(1-30)NH₂

Se realiza la síntesis de manera gradual usando equipo de síntesis de péptidos en fase sólida manual. Brevemente, se neutraliza resina de para-metilbenzidrilamina (MBHA) (Bachem, King of Prussia, PA) (720 mg, 0,50 mmol) con DIEA al 5% en DCM y se lava según el protocolo descrito en la tabla I. Se agita la disolución de Boc-Ada-OH (473 mg, 1,5 mmol) en DMF-DCM (1:1) con la resina neutralizada y DIC (235 µl, 1,5 mmol) en un aparato de síntesis de péptidos en fase sólida manual durante 1,5 horas. Una vez demostrado que se ha completado la reacción de acoplamiento mediante prueba de ninhidrina negativa, se realizan los protocolos de desprotección y neutralización descritos en la tabla I con el fin de retirar el grupo protector Boc y preparar el péptido-resina para el acoplamiento del siguiente aminoácido. Se continúa la síntesis y se construye la cadena peptídica gradualmente mediante el acoplamiento de los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina para obtener la secuencia peptídica deseada: Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OCH₃)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Glu(OCH₃)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Abu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Fpa⁵-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Cpa-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OCH₃)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por acilación con PhAc-OH.

Estos residuos de aminoácido protegidos (también disponibles comúnmente de Bachem, Novabiochem, Advanced Chemtech y Peptides International) se han representado anteriormente según un convenio bien aceptado. El grupo protector adecuado para el grupo funcional de cadena lateral de aminoácidos particulares aparece entre paréntesis. Los grupos OH en las fórmulas anteriores indican que el extremo carboxilo terminal de cada residuo está libre.

Se acoplan los aminoácidos protegidos (1,5 mmol cada uno) con DIC (235 µl, 1,5 mmol) con las excepciones de Boc-Asn-OH y Boc-Gln-OH que se acoplan con sus ésteres de HOBt formados previamente.

Con el fin de escindir el péptido de la resina y desprotegerlo, se agita una parte de 600 mg del péptido-resina seco con 0,6 ml de m-cresol y 6 ml de fluoruro de hidrógeno (HF) a 0°C durante 2 horas. Tras la evaporación del HF bajo una corriente de nitrógeno y a vacío, se lava el residuo con dietil éter y acetato de etilo secos. Se disuelve el péptido escindido y desprotegido en ácido acético al 50% y se separa de la resina mediante filtración. Tras la dilución con agua y liofilización, se obtienen 132 mg de producto bruto.

Se comprueba el péptido bruto mediante HPLC analítica usando un cromatógrafo de líquidos de Hewlett-Packard modelo HP-1090 con una columna de fase inversa Discovery HS C18 de Supelco (2,1 mm x 5 cm, rellena con gel de sílice C18, tamaño de poro de 120 Å, tamaño de partícula de 3 µm) (Supelco, Bellefonte, PA) y elución en gradiente lineal (por ejemplo, el 40-70% de B), con un sistema de disolventes que consiste en (A) TFA al 0,1% acuoso y (B) TFA al 0,1% en MeCN al 70% acuoso. Para la purificación mediante HPLC semipreparativa, se disuelven 135 mg de péptido bruto en AcOH/H₂O, se agita, se filtra y se aplica en una columna Ultraprep ODS de Beckman (21,2 mm x 15 cm, rellena con gel de sílice C18, tamaño de poro de 300 Å, tamaño de partícula de 10 µm). Se eluye la columna con un sistema de disolventes descrito anteriormente en un modo de gradiente lineal (por ejemplo, el 40-60% de B en 120 min); velocidad de flujo de 12 ml/min. Se monitoriza el eluyente a 220 nm y se examinan las fracciones mediante HPLC analítica. Se reúnen las fracciones con pureza superior al 95% y se liofilizan para dar 10,2 mg de producto puro. Se lleva a cabo la HPLC analítica en una columna de fase inversa C18 de Supelco descrita anteriormente usando elución isocrática con un sistema de disolventes descrito anteriormente con una velocidad de flujo de 0,2 ml/min. Se monitorizan los picos a 220 y 280 nm. Se considera que el producto es sustancialmente puro (>95%) mediante HPLC analítica. Se comprueba la masa molecular mediante espectrometría de masas por electropulverización y se confirma la composición de aminoácidos esperada mediante análisis de aminoácidos.

Según el procedimiento anterior se sintetizan el Péptido 12642, Péptido 12644, Péptido 12652, Péptido 12654, Péptido 12656, Péptido 12660, Péptido 12662, Péptido 12664, Péptido 12666, Péptido 12670, Péptido 12672,

Péptido 12674, Péptido 12740, Péptido 12780, Péptido 12890, Péptido 121409, Péptido 121410, Péptido 121501, Péptido 121502, Péptido 121601, Péptido 121602, Péptido 121603, Péptido 121604, Péptido 121605 y Péptido 121606 de la misma manera que el Péptido 12640, excepto porque estos péptidos también contienen otras sustituciones de aminoácidos en la secuencia peptídica y otros restos de acilo en sus extremos N-terminales. A continuación se exponen los detalles para estas síntesis.

Para la síntesis del Péptido 12642, cuya estructura química es [PhAc⁰-Tyr¹, D-Arg², Fpa5⁶, Ala⁸, Har⁹, Fpa5¹⁰, His¹¹, Orn¹², Abu¹⁵, Glu¹⁷, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹, Ada³⁰]hGH-RH(1-30)NH₂, se acoplan los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina de MBHA: Boc-Ada-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Glu(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Abu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por acilación con PhAc-OH.

Para la síntesis del Péptido 12644, cuya estructura química es [PhAc⁰-Tyr¹, D-Arg², Cpa⁶, (Me-Ala)⁸, Har⁹, Fpa5¹⁰, His¹¹, Orn¹², Abu¹⁵, Glu¹⁷, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹, Ada³⁰]hGH-RH(1-30)NH₂, se acoplan los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina de MBHA: Boc-Ada-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Glu(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Abu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-(Me-Ala)-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Cpa-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por acilación con PhAc-OH.

Para la síntesis del Péptido 12660, cuya estructura química es [PhAc⁰-Tyr¹, D-Arg², Cpa⁶, Ala⁸, Har⁹, Fpa5¹⁰, His¹¹, Orn¹², His¹⁵, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹, Ada³⁰]hGH-RH(1-30)NH₂, se acoplan los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina de MBHA: Boc-Ada-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Gln-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Cpa-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por acilación con PhAc-OH.

Para la síntesis del Péptido 12662, cuya estructura química es [PhAc⁰-Tyr¹, D-Arg², Cpa⁶, Ala⁸, Har⁹, Fpa5¹⁰, His¹¹, Orn¹², His¹⁵, Glu¹⁷, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹, Ada³⁰]hGH-RH(1-30)NH₂, se acoplan los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina de MBHA: Boc-Ada-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Glu(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Cpa-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por acilación con PhAc-OH.

Para la síntesis del Péptido 12670, cuya estructura química es [PhAc⁰-Tyr¹, D-Arg², Fpa5⁶, Ala⁸, Har⁹, Fpa5¹⁰, His¹¹, Orn¹², His¹⁵, Glu¹⁷, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹, Ada³⁰]hGH-RH(1-30)NH₂, se acoplan los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina de MBHA: Boc-Ada-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Glu(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por acilación con PhAc-OH.

Para la síntesis del Péptido 12890, cuya estructura química es [PhAc⁰-Fpa5¹, D-Arg², Cpa⁶, Ala⁸, Har⁹, Fpa5¹⁰, His¹¹, Orn¹², His¹⁵, Glu¹⁷, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹, Ada³⁰]hGH-RH(1-30)NH₂, se acoplan los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina de MBHA: Boc-Ada-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Glu(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Cpa-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Fpa5-OH, seguido por acilación con PhAc-OH.

Para la síntesis del Péptido 12652, cuya estructura química es [PhF₅Ac⁰-Tyr¹, D-Arg², Cpa⁶, Ala⁸, Har⁹, Fpa5¹⁰, His¹¹, Orn¹², Abu¹⁵, Glu¹⁷, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹, Ada³⁰]hGH-RH(1-30)NH₂, se acoplan los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina de MBHA: Boc-Ada-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Glu(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Abu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-Ala-OH,

Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Cpa-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por acilación con PhF₅Ac-OH.

Para la síntesis del Péptido 12654, cuya estructura química es [PhF₅Ac⁰-Tyr¹, D-Arg², Cpa⁶, Ala⁸, Har⁹, Fpa⁵¹⁰, His¹¹, Orn¹², His¹⁵, Glu¹⁷, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹, Ada³⁰]hGH-RH(1-30)NH₂, se acoplan los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina de MBHA: Boc-Ada-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Glu(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Cpa-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por acilación con PhF₅Ac-OH.

Para la síntesis del Péptido 12656, cuya estructura química es [PhF₅Ac⁰-Tyr¹, D-Arg², Cpa⁶, (Me-Ala)⁸, Har⁹, Fpa⁵¹⁰, His¹¹, Orn¹², Abu¹⁵, Glu¹⁷, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹, Ada³⁰]hGH-RH(1-30)NH₂, se acoplan los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina de MBHA: Boc-Ada-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Glu(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Abu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-(Me-Ala)-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Cpa-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por acilación con PhF₅Ac-OH.

Para la síntesis del Péptido 12664, cuya estructura química es [PhF₅Ac⁰-Tyr¹, D-Arg², Cpa⁶, (Me-Ala)⁸, Har⁹, Fpa⁵¹⁰, His¹¹, Orn¹², His¹⁵, Glu¹⁷, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹, Ada³⁰]hGH-RH(1-30)NH₂, se acoplan los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina de MBHA: Boc-Ada-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Glu(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-(Me-Ala)-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Cpa-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por acilación con PhF₅Ac-OH.

Para la síntesis del Péptido 12672, cuya estructura química es [PhF₅Ac⁰-Tyr¹, D-Arg², Fpa⁵⁶, Ala⁸, Har⁹, Fpa⁵¹⁰, His¹¹, Orn¹², Abu¹⁵, Glu¹⁷, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹, Ada³⁰]hGH-RH(1-30)NH₂, se acoplan los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina de MBHA: Boc-Ada-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Glu(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Abu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por acilación con PhF₅Ac-OH.

Para la síntesis del Péptido 12674, cuya estructura química es [PhF₅Ac⁰-Tyr¹, D-Arg², Fpa⁵⁶, Ala⁸, Har⁹, Fpa⁵¹⁰, His¹¹, Orn¹², His¹⁵, Glu¹⁷, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹, Ada³⁰]hGH-RH(1-30)NH₂, se acoplan los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina de MBHA: Boc-Ada-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Glu(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por acilación con PhF₅Ac-OH.

Para la síntesis del Péptido 12666, cuya estructura química es [(PhAc-Ada)⁰-Tyr¹, D-Arg², Fpa⁵⁶, (Me-Ala)⁸, Har⁹, Fpa⁵¹⁰, His¹¹, Orn¹², His¹⁵, Glu¹⁷, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹, Ada³⁰]hGH-RH(1-30)NH₂, se acoplan los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina de MBHA: Boc-Ada-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Glu(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Ile-OH, Boc-(Me-Ala)-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por acilación con PhAc-Ada-OH.

Para la síntesis del Péptido 12740, cuya estructura química es [(PhAc-Ada)⁰-Tyr¹, D-Arg², Fpa⁵⁶, Ala⁸, Har⁹, Fpa⁵¹⁰, His¹¹, Orn¹², Abu¹⁵, Glu¹⁷, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹, Ada³⁰]hGH-RH(1-30)NH₂, se acoplan los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina de MBHA: Boc-Ada-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Glu(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Abu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por acilación con PhAc-Ada-OH.

Para la síntesis del Péptido 12780, cuya estructura química es $[\text{PhF}_5\text{Ac-Ada}^0\text{-Tyr}^1\text{-D-Arg}^2\text{-Cpa}^6\text{-(Me-Ala)}^8\text{-Har}^9\text{-Fpa}^{10}\text{-His}^{11}\text{-Orn}^{12}\text{-His}^{15}\text{-Glu}^{17}\text{-His}^{20}\text{-Orn}^{21}\text{-Nle}^{27}\text{-D-Arg}^{28}\text{-Har}^{29}\text{-Ada}^{30}\text{]hGH-RH(1-30)NH}_2$, se acoplan los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina de MBHA: Boc-Ada-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Glu(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-(Me-Ala)-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Cpa-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por acilación con PhF₅Ac-Ada-OH.

EJEMPLO II

Ac-Ada⁰-Tyr¹-D-Arg²-Asp³-Ala⁴-Ile⁵-Cpa⁶-Trh⁷-Ala⁸-Har⁹-Fpa⁵¹⁰-His¹¹-Orn¹²-Val¹³-Leu¹⁴-Abu¹⁵-Gln¹⁶-Leu¹⁷-Ser¹⁸-Ala¹⁹-His²⁰-Orn²¹-Leu²²-Leu²³-Gln²⁴-Asp²⁵-Ile²⁶-Nle²⁷-D-Arg²⁸-Har²⁹-NH₂ (Péptido 12680)

$[(\text{Ac-Ada}^0\text{-Tyr}^1\text{-D-Arg}^2\text{-Cpa}^6\text{-Ala}^8\text{-Har}^9\text{-Fpa}^{10}\text{-His}^{11}\text{-Orn}^{12}\text{-Abu}^{15}\text{-His}^{20}\text{-Orn}^{21}\text{-Nle}^{27}\text{-D-Arg}^{28}\text{-Har}^{29}\text{]hGH-RH(1-29)NH}_2$

Se realiza la síntesis de manera gradual usando equipo de síntesis de péptidos en fase sólida manual. Brevemente, se neutraliza resina de para-metilbenzidrilamina (MBHA) (Bachem, King of Prussia, PA) (720 mg, 0,50 mmol) con DIEA al 5% en DCM y se lava según el protocolo descrito en la tabla I. Se agita la disolución de Boc-Har(NO₂)-OH (333 mg, 1,5 mmol) en DMF-DCM (1:1) con la resina neutralizada y DIC (235 µl, 1,5 mmol) en un aparato de síntesis de péptidos en fase sólida manual durante 1 hora. Una vez demostrado que se ha completado la reacción de acoplamiento mediante prueba de ninhidrina negativa, se realizan los protocolos de desprotección y neutralización descritos en la tabla I con el fin de retirar el grupo protector Boc y preparar el péptido-resina para el acoplamiento del siguiente aminoácido. Se continúa la síntesis y se construye la cadena peptídica gradualmente mediante el acoplamiento de los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina para obtener la secuencia peptídica deseada: Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Abu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Cpa-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por acilación con Ac-Ada-OH.

Estos residuos de aminoácido protegidos (también disponibles comúnmente de Bachem, Novabiochem, Advanced Chemtech y Peptides International) se han representado anteriormente según un convenio bien aceptado. El grupo protector adecuado para el grupo funcional de cadena lateral de aminoácidos particulares aparece entre paréntesis. Los grupos OH en las fórmulas anteriores indican que el extremo carboxilo terminal de cada residuo está libre.

Se acoplan los aminoácidos protegidos (1,5 mmol cada uno) con DIC (235 µl, 1,5 mmol) con las excepciones de Boc-Asn-OH y Boc-Gln-OH que se acoplan con sus ésteres de HOBT formados previamente.

Con el fin de escindir el péptido de la resina y desprotegerlo, se agita una parte de 500 mg del péptido-resina seco con 0,5 ml de m-cresol y 5 ml de fluoruro de hidrógeno (HF) a 0°C durante 2 horas. Tras la evaporación del HF bajo una corriente de nitrógeno y a vacío, se lava el residuo con dietil éter y acetato de etilo secos. Se disuelve el péptido escindido y desprotegido en ácido acético al 50% y se separa de la resina mediante filtración. Tras la dilución con agua y liofilización, se obtienen 167 mg de producto bruto.

Se comprueba el péptido bruto mediante HPLC analítica usando un cromatógrafo de líquidos de Hewlett-Packard modelo HP-1090 con una columna de fase inversa Discovery HS C18 de Supelco (2,1 mm x 5 cm, rellena con gel de sílice C18, tamaño de poro de 120 Å, tamaño de partícula de 3 µm) (Supelco, Bellefonte, PA) y elución en gradiente lineal (por ejemplo, el 40-70% de B), con un sistema de disolventes que consiste en (A) TFA al 0,1% acuoso y (B) TFA al 0,1% en MeCN al 70% acuoso. Para la purificación mediante HPLC semipreparativa, se disuelven 135 mg de péptido bruto en AcOH/H₂O se agita, se filtra y se aplica en una columna Ultraprep ODS de Beckman (21,2 mm x 15 cm, rellena con gel de sílice C18, tamaño de poro de 300 Å, tamaño de partícula de 10 µm). Se eluye la columna con un sistema de disolventes descrito anteriormente en un modo de gradiente lineal (por ejemplo, el 40-60% de B en 120 min); velocidad de flujo de 12 ml/min. Se monitoriza el eluyente a 220 nm y se examinan las fracciones mediante HPLC analítica. Se reúnen las fracciones con pureza superior al 95% y se liofilizan para dar 19,8 mg de producto puro. Se lleva a cabo la HPLC analítica en una columna de fase inversa C18 de Supelco descrita anteriormente usando elución isocrática con un sistema de disolventes descrito anteriormente con una velocidad de flujo de 0,2 ml/min. Se monitorizan los picos a 220 y 280 nm. Se considera que el producto es sustancialmente puro (>95%) mediante HPLC analítica. Se comprueba la masa molecular mediante espectrometría de masas por electropulverización y se confirma la composición de aminoácidos esperada mediante análisis de aminoácidos.

Según el procedimiento anterior se sintetizan el Péptido 12682, Péptido 12646, Péptido 12650, Péptido 12684, Péptido 12690, Péptido 12692, Péptido 12694, Péptido 12696, Péptido 12698, Péptido 12710, Péptido 12712, Péptido 12714, Péptido 12716, Péptido 12720, Péptido 12730, Péptido 12750, Péptido 12760, Péptido 12770, Péptido 12880, Péptido 121101, Péptido 121102, Péptido 121103, Péptido 121104, Péptido 121105, Péptido

121106, Péptido 121107, Péptido 121108, Péptido 121109, Péptido 121110, Péptido 121111, Péptido 121112, Péptido 121113, Péptido 121114, Péptido 121115, Péptido 121116, Péptido 121117, Péptido 121118, Péptido 121119, Péptido 121120, Péptido 121121, Péptido 121122, Péptido 121123, Péptido 121124, Péptido 121125, Péptido 121126, Péptido 121127, Péptido 121128, Péptido 121129, Péptido 121130, 121131, Péptido 121132, Péptido 121133, Péptido 121134, Péptido 121135, Péptido 121136, Péptido 121137, Péptido 121138, Péptido 121139, Péptido 121140, 121141, Péptido 121142, Péptido 121143, Péptido 121144, Péptido 121411, Péptido 121412, Péptido 121413, Péptido 121414, Péptido 121503, Péptido 121504, Péptido 121505 y Péptido 121506 de la misma manera que el Péptido 12680, excepto porque estos péptidos también contienen otras sustituciones de aminoácidos en la secuencia peptídica y otros restos de acilo en sus extremos N-terminales. A continuación se exponen los detalles para estas síntesis.

Para la síntesis del Péptido 12682, cuya estructura química es [(Ac-Ada)⁰-Tyr¹, D-Arg², Cpa⁶, Ala⁸, Har⁹, Fpa⁵¹⁰, His¹¹, Orn¹², His¹⁵, Glu¹⁷, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹]hGH-RH(1-29)NH₂, se acoplan los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina de MBHA: Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Glu(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Cpa-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por acilación con Ac-Ada-OH.

Para la síntesis del Péptido 12684, cuya estructura química es [(Ac-Ada)⁰-Tyr¹, D-Arg², Cpa⁶, (Me-Ala)⁸, Har⁹, Fpa⁵¹⁰, His¹¹, Orn¹², His¹⁵, Glu¹⁷, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹]hGH-RH(1-29)NH₂, se acoplan los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina de MBHA: Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Glu(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-(Me-Ala)-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Cpa-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por acilación con Ac-Ada-OH.

Para la síntesis del Péptido 12690, cuya estructura química es [(PhAc-Ada)⁰-Tyr¹, D-Arg², Cpa⁶, Ala⁸, Har⁹, Fpa⁵¹⁰, His¹¹, Orn¹², Abu¹⁵, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹]hGH-RH(1-29)NH₂, se acoplan los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina de MBHA: Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Abu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Cpa-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por acilación con PhAc-Ada-OH.

Para la síntesis del Péptido 12694, cuya estructura química es [(PhAc-Ada)⁰-Tyr¹, D-Arg², Cpa⁶, (Me-Ala)⁸, Har⁹, Fpa⁵¹⁰, His¹¹, Orn¹², Abu¹⁵, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹]hGH-RH(1-29)NH₂, se acoplan los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina de MBHA: Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Abu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-(Me-Ala)-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Cpa-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por acilación con PhAc-Ada-OH.

Para la síntesis del Péptido 12696, cuya estructura química es [(PhAc-Ada)⁰-Tyr¹, D-Arg², Cpa⁶, (Me-Ala)⁸, Har⁹, Fpa⁵¹⁰, His¹¹, Orn¹², His¹⁵, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹]hGH-RH(1-29)NH₂, se acoplan los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina de MBHA: Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Gln-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-(Me-Ala)-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Cpa-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por acilación con PhAc-Ada-OH.

Para la síntesis del Péptido 12698, cuya estructura química es [(PhAc-Ada)⁰-Tyr¹, D-Arg², Cpa⁶, (Me-Ala)⁸, Har⁹, Fpa⁵¹⁰, His¹¹, Orn¹², His¹⁵, Glu¹⁷, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹]hGH-RH(1-29)NH₂, se acoplan los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina de MBHA: Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Glu(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-(Me-Ala)-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Cpa-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por acilación con PhAc-Ada-OH.

Para la síntesis del Péptido 12710, cuya estructura química es [(PhAc-Ada)⁰-Tyr¹, D-Arg², Cpa⁶, Ala⁸, Har⁹, Fpa⁵¹⁰, His¹¹, Orn¹², His¹⁵, Glu¹⁷, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹]hGH-RH(1-29)NH₂, se acoplan los siguientes

aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina de MBHA: Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Glu(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Cpa-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por acilación con PhAc-Ada-OH.

Para la síntesis del Péptido 12712, cuya estructura química es [(PhAc-Ada)⁰-Tyr¹, D-Arg², Cpa⁶, Ala⁸, Har⁹, Fpa5¹⁰, His¹¹, Orn¹², Leu¹³, Abu¹⁵, Glu¹⁷, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹]hGH-RH(1-29)NH₂, se acoplan los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina de MBHA: Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Glu(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Abu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Cpa-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por acilación con PhAc-Ada-OH.

Para la síntesis del Péptido 12714, cuya estructura química es [PhF₅Ac⁰-Tyr¹, D-Arg², Cpa⁶, Ala⁸, Har⁹, Fpa5¹⁰, His¹¹, Orn¹², Leu¹³, Abu¹⁵, Glu¹⁷, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹]hGH-RH(1-29)NH₂, se acoplan los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina de MBHA: Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Glu(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Abu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Cpa-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por acilación con PhF₅Ac-OH.

Para la síntesis del Péptido 12716, cuya estructura química es [(PhF₅Ac-Ada)⁰-Tyr¹, D-Arg², Cpa⁶, (Me-Ala)⁸, Har⁹, Fpa5¹⁰, His¹¹, Orn¹², His¹⁵, Glu¹⁷, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹]hGH-RH(1-29)NH₂, se acoplan los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina de MBHA: Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Glu(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Cpa-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por acilación con PhF₅Ac-Ada-OH.

Para la síntesis del Péptido 12730, cuya estructura química es [(PhAc-Ada)⁰-Tyr¹, D-Arg², Fpa5⁶, Ala⁸, Har⁹, Fpa5¹⁰, His¹¹, Orn¹², Abu¹⁵, Glu¹⁷, His²¹, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹]hGH-RH(1-29)NH₂, se acoplan los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina de MBHA: Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Glu(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Abu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por acilación con PhAc-Ada-OH.

Para la síntesis del Péptido 12750, cuya estructura química es [(PhAc-Ada)⁰-Tyr¹, D-Arg², Fpa5⁶, Ala⁸, Har⁹, Fpa5¹⁰, His¹¹, Orn¹², His¹⁵, Glu¹⁷, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹]hGH-RH(1-29)NH₂, se acoplan los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina de MBHA: Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Glu(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por acilación con PhAc-Ada-OH.

Para la síntesis del Péptido 12770, cuya estructura química es [(Ac-Ada)⁰-Tyr¹, D-Arg², Fpa5⁶, Ala⁸, Har⁹, Fpa5¹⁰, His¹¹, Orn¹², Abu¹⁵, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹]hGH-RH(1-29)NH₂, se acoplan los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina de MBHA: Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Abu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por acilación con Ac-Ada-OH.

Para la síntesis del Péptido 12650, cuya estructura química es [PhF₅Ac⁰-Tyr¹, D-Arg², Cpa⁶, Ala⁸, Har⁹, Fpa5¹⁰, His¹¹, Orn¹², Abu¹⁵, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹]hGH-RH(1-29)NH₂, se acoplan los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina de MBHA: Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Abu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Cpa-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-

OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por acilación con PhF₅Ac-Ada-OH.

Para la síntesis del Péptido 12692, cuya estructura química es [(PhF₅Ac-Ada)⁰-Tyr¹, D-Arg², Cpa⁶, Ala⁸, Har⁹, Fpa⁵¹⁰, His¹¹, Orn¹², Abu¹⁵, Glu¹⁷, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹]hGH-RH(1-29)NH₂, se acoplan los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina de MBHA: Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Glu(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Abu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Fpa⁵-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Cpa-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por

acilación con PhF₅Ac-Ada-OH.

Para la síntesis del Péptido 12720, cuya estructura química es [(CH₃-(CH₂)₁₀-CO-Ada)⁰-Tyr¹, D-Arg², Cpa⁶, Ala⁸, Har⁹, Fpa⁵¹⁰, His¹¹, Orn¹², Abu¹⁵, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹]hGH-RH(1-29)NH₂, se acoplan los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina de MBHA: Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Abu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Fpa⁵-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Cpa-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por acilación con (CH₃-(CH₂)₁₀-CO-Ada-OH.

Para la síntesis del Péptido 12760, cuya estructura química es [(CH₃-(CH₂)₁₀-CO-Ada)⁰-Tyr¹, D-Arg², Fpa⁵⁶, Ala⁸, Har⁹, Fpa⁵¹⁰, His¹¹, Orn¹², Abu¹⁵, Glu¹⁷, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹]hGH-RH(1-29)NH₂, se acoplan los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina de MBHA: Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Glu(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Abu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Fpa⁵-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Fpa⁵-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por acilación con (CH₃-(CH₂)₁₀-CO-Ada-OH.

Para la síntesis del Péptido 121101, cuya estructura química es [(PhAc-Ada)⁰-Tyr¹, D-Arg², Cpa⁶, Ala⁸, Har⁹, Fpa⁵¹⁰, His¹¹, Orn¹², His¹⁵, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹]hGH-RH(1-29)NH₂, se acoplan los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina de MBHA: Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Gln-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Fpa⁵-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Cpa-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por acilación con PhAc-Ada-OH.

Para la síntesis del Péptido 12880, cuya estructura química es [(PhAc-Ada)⁰-Fpa⁵¹, D-Arg², Cpa⁶, Ala⁸, Har⁹, Fpa⁵¹⁰, His¹¹, Orn¹², His¹⁵, Glu¹⁷, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹]hGH-RH(1-29)NH₂, se acoplan los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina de MBHA: Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Glu(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Fpa⁵-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Cpa-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Fpa⁵-OH, seguido por acilación con PhAc-Ada-OH.

EJEMPLO III

(PhF₅Ac-Ada)⁰-Tyr¹-D-Arg²-Asp³-Ala⁴-Ile⁵-Cpa⁶-Trh⁷-(Me-Ala)⁸-Har⁹-Fpa⁵¹⁰-His¹¹-Orn¹²-Val¹³-Leu¹⁴-His¹⁵-Gln¹⁶-Glu¹⁷-Ser¹⁸-Ala¹⁹-His²⁰-Orn²¹-Leu²²-Leu²³-Gln²⁴-Asp²⁵-Ile²⁶-Nle²⁷-D-Arg²⁸-Har²⁹-Agm³⁰ (Péptido 12800)

[(PhF₅Ac-Ada)⁰-Tyr¹, D-Arg², Cpa⁶, (Me-Ala)⁸, Har⁹, Fpa⁵¹⁰, His¹¹, Orn¹², His¹⁵, Glu¹⁷, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹, Agm³⁰]hGH-RH(1-30)

Se realiza la síntesis de manera gradual usando equipo de síntesis de péptidos en fase sólida manual. El material de partida de la síntesis es resina de Boc-agmatina-N⁶-sulfonil-fenoxiacetil-MBHA (Boc-Agm-SPA-MBHA) con una sustitución de 0,3 mmol/g, que se obtuvo comercialmente de California Peptide Research, Inc. (Napa, CA). La síntesis de esta resina se ha descrito en la patente estadounidense n.º 4.914.189 y en la bibliografía científica (Zarandi M, Serfozo P, Zsigo J, Bokser L, Janaky T, Olsen DB, Bajusz S, Schally AV, Int. J. Peptide Protein Res. 39: 211-217, 1992), incorporada al presente documento como referencia. Brevemente, se hincha previamente resina de Boc-Agm-SPA-MBHA (1,67 g, 0,50 mmol) en DCM y entonces se realizan los protocolos de desprotección y neutralización descritos en la tabla I con el fin de retirar el grupo protector Boc y preparar el péptido-resina para el acoplamiento del siguiente aminoácido. Una vez demostrado que se ha completado la reacción de acoplamiento mediante prueba de ninhidrina negativa, se realizan los protocolos de desprotección y neutralización descritos en la tabla I, y se continúa la síntesis. Se construye la cadena peptídica gradualmente mediante el acoplamiento de los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina de Agm-SPA-MBHA para obtener la secuencia

peptídica deseada: Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2CIZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Glu(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2CIZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-(Me-Ala)-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Cpa-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por acilación con PhF₅Ac-Ada-OH.

Estos residuos de aminoácido protegidos (también disponibles comúnmente de Bachem, Novabiochem, Advanced Chemtech y Peptides International) se han representado anteriormente según un convenio bien aceptado. El grupo protector adecuado para el grupo funcional de cadena lateral de aminoácidos particulares aparece entre paréntesis. Los grupos OH en las fórmulas anteriores indican que el extremo carboxilo terminal de cada residuo está libre.

Se acoplan los aminoácidos protegidos (1,5 mmol cada uno) con DIC (235 µl, 1,5 mmol) con las excepciones de Boc-Asn-OH y Boc-Gln-OH que se acoplan con sus ésteres de HOBt formados previamente.

Con el fin de escindir el péptido de la resina y desprotegerlo, se agita una parte de 500 mg del péptido-resina seco con 0,5 ml de m-cresol y 5 ml de fluoruro de hidrógeno (HF) a 0°C durante 2 horas. Tras la evaporación del HF bajo una corriente de nitrógeno y a vacío, se lava el residuo con dietil éter y acetato de etilo secos. Se disuelve el péptido escindido y desprotegido en ácido acético al 50% y se separa de la resina mediante filtración. Tras la dilución con agua y liofilización, se obtienen 127 mg de producto bruto.

Se comprueba el péptido bruto mediante HPLC analítica usando un cromatógrafo de líquidos de Hewlett-Packard modelo HP-1090 con una columna de fase inversa Discovery HS C18 de Supelco (2,1 mm x 5 cm, rellena con gel de sílice C18, tamaño de poro de 120 Å, tamaño de partícula de 3 µm) (Supelco, Bellefonte, PA) y elución en gradiente lineal (por ejemplo, el 40-70% de B), con un sistema de disolventes que consiste en (A) TFA al 0,1% acuoso y (B) TFA al 0,1% en MeCN al 70% acuoso. Para la purificación mediante HPLC semipreparativa, se disuelven 135 mg de péptido bruto en AcOH/H₂O, se agita, se filtra y se aplica en una columna Ultraprep ODS de Beckman (21,2 mm x 15 cm, rellena con gel de sílice C18, tamaño de poro de 300 Å, tamaño de partícula de 10 µm). Se eluye la columna con un sistema de disolventes descrito anteriormente en un modo de gradiente lineal (por ejemplo, el 40-60% de B en 120 min); velocidad de flujo de 12 ml/min. Se monitoriza el eluyente a 220 nm y se examinan las fracciones mediante HPLC analítica. Se reúnen las fracciones con pureza superior al 95% y se liofilizan para dar 11,3 mg de producto puro. Se lleva a cabo la HPLC analítica en una columna de fase inversa C18 de Supelco descrita anteriormente usando elución isocrática con un sistema de disolventes descrito anteriormente con una velocidad de flujo de 0,2 ml/min. Se monitorizan los picos a 220 y 280 nm. Se considera que el producto es sustancialmente puro (>95%) mediante HPLC analítica. Se comprueba la masa molecular mediante espectrometría de masas por electropulverización y se confirma la composición de aminoácidos esperada mediante análisis de aminoácidos.

Según el procedimiento anterior, se sintetizan el Péptido 12802, Péptido 12804, Péptido 12806, Péptido 12808, Péptido 12810, Péptido 12812, Péptido 12814, Péptido 12816, Péptido 12818, Péptido 12900, Péptido 121001, Péptido 121002, Péptido 121003, Péptido 121004, Péptido 121005, Péptido 121006, Péptido 121007, Péptido 121008, Péptido 121009, Péptido 121010, Péptido 121011, Péptido 121012, Péptido 121013, Péptido 121014, Péptido 121015, Péptido 121016, Péptido 121017, Péptido 121018, Péptido 121019, Péptido 121020, Péptido 121021, Péptido 121022, Péptido 121023, Péptido 121024, Péptido 121025, Péptido 121026, Péptido 121027, Péptido 121028, Péptido 121029, Péptido 121030, 121031, Péptido 121032, Péptido 121033, Péptido 121034, Péptido 121035, Péptido 121036, Péptido 121037, Péptido 121038, Péptido 121039, Péptido 121040, Péptido 121041, Péptido 121042, Péptido 121043, Péptido 121044, Péptido 121045, Péptido 121046, Péptido 121047, Péptido 121048, Péptido 121049, Péptido 121050, Péptido 121051, Péptido 121052, Péptido 121053, Péptido 121054, Péptido 121055, Péptido 121056, Péptido 121057, Péptido 121058, Péptido 121059, Péptido 121060, Péptido 121061, Péptido 121062, Péptido 121063, Péptido 121064, Péptido 121065, Péptido 121066, Péptido 121067, Péptido 121068, Péptido 121069, Péptido 121070, Péptido 121071, Péptido 121072, Péptido 121073, Péptido 121074, Péptido 121075, Péptido 121401, Péptido 121402, Péptido 121403, Péptido 121404, 121405, Péptido 121406, Péptido 121407, Péptido 121408 y Péptido 121701 de la misma manera que el Péptido 12800, excepto porque estos péptidos también contienen otras sustituciones de aminoácidos en la secuencia peptídica y otros restos de acilo en sus extremos N-terminales. A continuación se exponen los detalles para estas síntesis.

Para la síntesis del Péptido 12802, cuya estructura química es [(PhAc-Ada)⁰-Tyr¹, D-Arg², Cpa⁶, (Me-Ala)⁸, Har⁹, Fpa5¹⁰, His¹¹, Orn¹², His¹⁵, Glu¹⁷, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹, Agm³⁰]hGH-RH(1-30), se acoplan los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina de Agm-SPA-MBHA: Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2CIZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Glu(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2CIZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-(Me-Ala)-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Cpa-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por acilación con PhAc-Ada-OH.

Para la síntesis del Péptido 12804, cuya estructura química es [(Ac-Ada)⁰-Tyr¹, D-Arg², Cpa⁶, (Me-Ala)⁸, Har⁹, Fpa5¹⁰, His¹¹, Orn¹², His¹⁵, Glu¹⁷, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹, Agm³⁰]hGH-RH(1-30), se acoplan los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina de Agm-SPA-MBHA: Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-

OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Glu(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-(Me-Ala)-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Cpa-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por acilación con Ac-Ada-OH.

Para la síntesis del Péptido 12806, cuya estructura química es [(CH₃-(CH₂)₁₀-CO-Ada)⁰-Tyr¹, D-Arg², Cpa⁶, (Me-Ala)⁸, Har⁹, Fpa5¹⁰, His¹¹, Orn¹², His¹⁵, Glu¹⁷, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹, Agm³⁰]hGH-RH(1-30), se acoplan los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina de Agm-SPA-MBHA: Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Glu(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-(Me-Ala)-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Cpa-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por acilación con (CH₃-(CH₂)₁₀-CO-Ada-OH.

Para la síntesis del Péptido 12808, cuya estructura química es [(Dca-Ada)⁰-Tyr¹, D-Arg², Cpa⁶, (Me-Ala)⁸, Har⁹, Fpa5¹⁰, His¹¹, Orn¹², His¹⁵, Glu¹⁷, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹, Agm³⁰]hGH-RH(1-30), se acoplan los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina de Agm-SPA-MBHA: Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Glu(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-(Me-Ala)-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Cpa-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por acilación con Dca-Ada-OH.

Para la síntesis del Péptido 12810, cuya estructura química es [(PhF₅Ac-Ada)⁰-Tyr¹, D-Arg², Fpa5⁶, (Me-Ala)⁸, Har⁹, Fpa5¹⁰, His¹¹, Orn¹², His¹⁵, Glu¹⁷, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹, Agm³⁰]hGH-RH(1-30), se acoplan los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina de Agm-SPA-MBHA: Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Glu(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-(Me-Ala)-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por acilación con PhF₅Ac-Ada-OH.

Para la síntesis del Péptido 12812, cuya estructura química es [(PhAc-Ada)⁰-Tyr¹, D-Arg², Fpa5⁶, (Me-Ala)⁸, Har⁹, Fpa5¹⁰, His¹¹, Orn¹², His¹⁵, Glu¹⁷, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹, Agm³⁰]hGH-RH(1-30), se acoplan los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina de Agm-SPA-MBHA: Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Glu(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-(Me-Ala)-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por acilación con PhAc-Ada-OH.

Para la síntesis del Péptido 12814, cuya estructura química es [(Ac-Ada)⁰-Tyr¹, D-Arg², Fpa5⁶, (Me-Ala)⁸, Har⁹, Fpa5¹⁰, His¹¹, Orn¹², His¹⁵, Glu¹⁷, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹, Agm³⁰]hGH-RH(1-30), se acoplan los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina de Agm-SPA-MBHA: Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Glu(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-(Me-Ala)-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por acilación con Ac-Ada-OH.

Para la síntesis del Péptido 12816, cuya estructura química es [(CH₃-(CH₂)₁₀-CO-Ada)⁰-Tyr¹, D-Arg², Fpa5⁶, (Me-Ala)⁸, Har⁹, Fpa5¹⁰, His¹¹, Orn¹², His¹⁵, Glu¹⁷, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹, Agm³⁰]hGH-RH(1-30), se acoplan los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina de Agm-SPA-MBHA: Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Glu(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-(Me-Ala)-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por acilación con (CH₃-(CH₂)₁₀-CO-Ada-OH.

Para la síntesis del Péptido 12900, cuya estructura química es [(PhAc-Ada)⁰-Fpa5¹, D-Arg², Cpa⁶, Ala⁸, Har⁹, Fpa5¹⁰, His¹¹, Orn¹², His¹⁵, Glu¹⁷, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹, Agm³⁰]hGH-RH(1-30), se acoplan los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina de Agm-SPA-MBHA: Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Glu(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-

Thr(Bzl)-OH, Boc-Cpa-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Fpa5-OH, seguido por acilación con PhAc-Ada-OH.

EJEMPLO IV

(PhF₅Ac-Ada)⁰-Tyr¹-D-Arg²-Asp³-Ala⁴-Ile⁵-Cpa⁶-Trh⁷-(Me-Ala)⁸-Har⁹-Fpa5¹⁰-His¹¹-Orn¹²-Val¹³-Leu¹⁴-His¹⁵-Gln¹⁶-Glu¹⁷-Ser¹⁸-Ala¹⁹-His²⁰-Orn²¹-Leu²²-Leu²³-Gln²⁴-Asp²⁵-Ile²⁶-Nle²⁷-D-Arg²⁸-Har²⁹-Ada³⁰-OH (Péptido 12840)

[(PhF₅Ac-Ada)⁰-Tyr¹, D-Arg², Cpa⁶, (Me-Ala)⁸, Har⁹, Fpa5¹⁰, His¹¹, Orn¹², His¹⁵, Glu¹⁷, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹, Ada³⁰]hGH-RH(1-30)OH

Se realiza la síntesis de manera gradual usando equipo de síntesis de péptidos en fase sólida manual. Brevemente, se hincha previamente resina de Boc-Ada-Merrifield (NovaBiochem, EE.UU.) (1,00 g, 0,50 mmol) en DCM y entonces se realizan los protocolos de desprotección y neutralización descritos en la tabla I con el fin de retirar el grupo protector Boc y preparar el péptido-resina para el acoplamiento del siguiente aminoácido. Una vez demostrado que se ha completado la reacción de acoplamiento mediante prueba de ninhidrina negativa, se realizan los protocolos de desprotección y neutralización descritos en la tabla I. Se continúa la síntesis y se construye la cadena peptídica gradualmente mediante el acoplamiento de los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina de Ada-Merrifield para obtener la secuencia peptídica deseada: Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Glu(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-(Me-Ala)-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Cpa-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por acilación con PhF₅Ac-Ada-OH.

Estos residuos de aminoácido protegidos (también disponibles comúnmente de Bachem, Novabiochem, Advanced Chemtech y Peptides International) se han representado anteriormente según un convenio bien aceptado. El grupo protector adecuado para el grupo funcional de cadena lateral de aminoácidos particulares aparece entre paréntesis. Los grupos OH en las fórmulas anteriores indican que el extremo carboxilo terminal de cada residuo está libre.

Se acoplan los aminoácidos protegidos (1,5 mmol cada uno) con DIC (235 µl, 1,5 mmol) con las excepciones de Boc-Asn-OH y Boc-Gln-OH que se acoplan con sus ésteres de HOBT formados previamente.

Con el fin de escindir el péptido de la resina y desprotegerlo, se agita una parte de 500 mg del péptido-resina seco con 0,5 ml de m-cresol y 5 ml de fluoruro de hidrógeno (HF) a 0°C durante 2 horas. Tras la evaporación del HF bajo una corriente de nitrógeno y a vacío, se lava el residuo con dietil éter y acetato de etilo secos. Se disuelve el péptido escindido y desprotegido en ácido acético al 50% y se separa de la resina mediante filtración. Tras la dilución con agua y liofilización, se obtienen 107 mg de producto bruto.

Se comprueba el péptido bruto mediante HPLC analítica usando un cromatógrafo de líquidos de Hewlett-Packard modelo HP-1090 con una columna de fase inversa Discovery HS C18 de Supelco (2,1 mm x 5 cm, rellena con gel de sílice C18, tamaño de poro de 120 Å, tamaño de partícula de 3 µm) (Supelco, Bellefonte, PA) y elución en gradiente lineal (por ejemplo, el 40-70% de B), con un sistema de disolventes que consiste en (A) TFA al 0,1% acuoso y (B) TFA al 0,1% en MeCN al 70% acuoso. Para la purificación mediante HPLC semipreparativa, se disuelven 135 mg de péptido bruto en AcOH/H₂O, se agita, se filtra y se aplica en una columna Ultraprep ODS de Beckman (21,2 mm x 15 cm, rellena con gel de sílice C18, tamaño de poro de 300 Å, tamaño de partícula de 10 µm). Se eluye la columna con un sistema de disolventes descrito anteriormente en un modo de gradiente lineal (por ejemplo, el 40-60% de B en 120 min); velocidad de flujo de 12 ml/min. Se monitoriza el eluyente a 220 nm y se examinan las fracciones mediante HPLC analítica. Se reúnen las fracciones con pureza superior al 95% y se liofilizan para dar 11,3 mg de producto puro. Se lleva a cabo la HPLC analítica en una columna de fase inversa C18 de Supelco descrita anteriormente usando elución isocrática con un sistema de disolventes descrito anteriormente con una velocidad de flujo de 0,2 ml/min. Se monitorizan los picos a 220 y 280 nm. Se considera que el producto es sustancialmente puro (>95%) mediante HPLC analítica. Se comprueba la masa molecular mediante espectrometría de masas por electropulverización y se confirma la composición de aminoácidos esperada mediante análisis de aminoácidos.

Según el procedimiento anterior se sintetizan el Péptido 12840, Péptido 12844, Péptido 12846, Péptido 12848, Péptido 12850, Péptido 12852, Péptido 12854, Péptido 12860, Péptido 12862, Péptido 12864, Péptido 12866, Péptido 12868, Péptido 12870, Péptido 12872, Péptido 12874, Péptido 12920, Péptido 121201, Péptido 12202, Péptido 121203, Péptido 121204, Péptido 121205, Péptido 121206, Péptido 121207, Péptido 121208, Péptido 121209, Péptido 121210, Péptido 121211, Péptido 121212, Péptido 121213, Péptido 121214, Péptido 121215, Péptido 121216, Péptido 121217, Péptido 121218, Péptido 121219, Péptido 121220, Péptido 121221, Péptido 121222, Péptido 121223, Péptido 121224, Péptido 121225, Péptido 121226, Péptido 121227, Péptido 121228, Péptido 121229, Péptido 121230, Péptido 121231, Péptido 121232, Péptido 121233, Péptido 121234, Péptido 121235, Péptido 121236, Péptido 121237, Péptido 121238, Péptido 121239 y Péptido 121240 de la misma manera que el Péptido 12840, excepto porque estos péptidos también contienen otras sustituciones de aminoácidos en la secuencia peptídica y otros restos de acilo en sus extremos N-terminales. A continuación se exponen los detalles

para estas síntesis.

Para la síntesis del Péptido 12842, cuya estructura química es [(PhAc-Ada)⁰-Tyr¹, D-Arg², Cpa⁶, (Me-Ala)⁸, Har⁹, Fpa⁵¹⁰, His¹¹, Orn¹², His¹⁵, Glu¹⁷, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹, Ada³⁰]hGH-RH(1-30)OH, se acoplan los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina de Ada-Merrifield: Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Glu(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-(Me-Ala)-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Cpa-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por acilación con PhAc-Ada-OH.

Para la síntesis del Péptido 12844, cuya estructura química es [(Ac-Ada)⁰-Tyr¹, D-Arg², Cpa⁶, (Me-Ala)⁸, Har⁹, Fpa⁵¹⁰, His¹¹, Orn¹², His¹⁵, Glu¹⁷, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹, Ada³⁰]hGH-RH(1-30)OH, se acoplan los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina de Ada-Merrifield: Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Glu(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-(Me-Ala)-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Cpa-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por acilación con Ac-Ada-OH.

Para la síntesis del Péptido 12846, cuya estructura química es [(CH₃-(CH₂)₁₀-CO-Ada)⁰-Tyr¹, D-Arg², Cpa⁶, (Me-Ala)⁸, Har⁹, Fpa⁵¹⁰, His¹¹, Orn¹², His¹⁵, Glu¹⁷, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹, Ada³⁰]hGH-RH(1-30)OH, se acoplan los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina de Ada-Merrifield: Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Glu(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-(Me-Ala)-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Cpa-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por acilación con (CH₃-(CH₂)₁₀-CO-Ada-OH.

Para la síntesis del Péptido 12848, cuya estructura química es [(DcaAda)⁰-Tyr¹, D-Arg², Cpa⁶, (Me-Ala)⁸, Har⁹, Fpa⁵¹⁰, His¹¹, Orn¹², His¹⁵, Glu¹⁷, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹, Ada³⁰]hGH-RH(1-30)OH, se acoplan los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina de Ada-Merrifield: Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Glu(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-(Me-Ala)-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Cpa-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por acilación con Dca-Ada-OH.

Para la síntesis del Péptido 12850, cuya estructura química es [PhF₅Ac⁰-Tyr¹, D-Arg², Cpa⁶, (Me-Ala)⁸, Har⁹, Fpa⁵¹⁰, His¹¹, Orn¹², His¹⁵, Glu¹⁷, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹, Ada³⁰]hGH-RH(1-30)OH, se acoplan los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina de Ada-Merrifield: Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Glu(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-(Me-Ala)-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Cpa-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por acilación con PhF₅Ac-OH.

Para la síntesis del Péptido 12852, cuya estructura química es [PhAc⁰-Tyr¹, D-Arg², Cpa⁶, (Me-Ala)⁸, Har⁹, Fpa⁵¹⁰, His¹¹, Orn¹², His¹⁵, Glu¹⁷, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹, Ada³⁰]hGH-RH(1-30)OH, se acoplan los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina de Ada-Merrifield: Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Glu(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-(Me-Ala)-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Cpa-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por acilación con PhAc-OH.

Para la síntesis del Péptido 12854, cuya estructura química es [Dca⁰-Tyr¹, D-Arg², Cpa⁶, (Me-Ala)⁸, Har⁹, Fpa⁵¹⁰, His¹¹, Orn¹², His¹⁵, Glu¹⁷, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹, Ada³⁰]hGH-RH(1-30)OH, se acoplan los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina de Ada-Merrifield: Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Glu(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-(Me-Ala)-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Cpa-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por acilación con Dca-OH.

Para la síntesis del Péptido 12860, cuya estructura química es [(PhF₅Ac-Ada)⁰-Tyr¹, D-Arg², Fpa⁵⁶, (Me-Ala)⁸, Har⁹,

5

10

20

30

40

45

55

65

His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Glu(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-(Me-Ala)-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por acilación con Dca-OH.

Para la síntesis del Péptido 12920, cuya estructura química es [(PhAc-Ada)⁰-Fpa5¹, D-Arg², Cpa⁶, Ala⁸, Har⁹, Fpa5¹⁰, His¹¹, Orn¹², His¹⁵, Glu¹⁷, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹, Ada³⁰]hGH-RH(1-30)OH, se acoplan los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina de Ada-Merrifield: Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Glu(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Cpa-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Fpa5-OH, seguido por acilación con PhAc-Ada-OH.

EJEMPLO V

PhAc-Ada⁰-Tyr¹-D-Arg²-Asp³-Ala⁴-Ile⁵-Cpa⁶-Trh⁷-Ala⁸-Har⁹-Fpa5¹⁰-His¹¹-Orn¹²-Val¹³-Leu¹⁴-His¹⁵-Gln¹⁶-Leu¹⁷-Ser¹⁸-Ala¹⁹-His²⁰-Orn²¹-Leu²²-Leu²³-Gln²⁴-Asp²⁵-Ile²⁶-Nle²⁷-D-Arg²⁸-Har²⁹-Har³⁰-NH₂ (Péptido 121301)

[PhAc-Ada⁰-Tyr¹, D-Arg², Cpa⁶, Ala⁸, Har⁹, Fpa5¹⁰, His¹¹, Orn¹², His¹⁵, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹, Har³⁰]hGH-RH(1-30)NH₂

Se realiza la síntesis de manera gradual usando equipo de síntesis de péptidos en fase sólida manual. Brevemente, se neutraliza resina de para-metilbenzidrilamina (MBHA) (Bachem, King of Prussia, PA) (720 mg, 0,50 mmol) con DIEA al 5% en DCM y se lava según el protocolo descrito en la tabla I. Se agita la disolución de Boc-Har(NO₂)-OH (333 mg, 1,5 mmol) en DMF con la resina neutralizada y DIC (235 µl, 1,5 mmol) en un aparato de síntesis de péptidos en fase sólida manual durante 1,5 horas. Una vez demostrado que se ha completado la reacción de acoplamiento mediante prueba de ninhidrina negativa, se realizan los protocolos de desprotección y neutralización descritos en la tabla I con el fin de retirar el grupo protector Boc y preparar el péptido-resina para el acoplamiento del siguiente aminoácido. Se continúa la síntesis y se construye la cadena peptídica gradualmente mediante el acoplamiento de los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina para obtener la secuencia peptídica deseada: Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Gln-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Cpa-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por acilación con PhAc-Ada-OH.

Estos residuos de aminoácido protegidos (también disponibles comúnmente de Bachem, Novabiochem, Advanced Chemtech y Peptides International) se han representado anteriormente según un convenio bien aceptado. El grupo protector adecuado para el grupo funcional de cadena lateral de aminoácidos particulares aparece entre paréntesis. Los grupos OH en las fórmulas anteriores indican que el extremo carboxilo terminal de cada residuo está libre.

Se acoplan los aminoácidos protegidos (1,5 mmol cada uno) con DIC (235 µl, 1,5 mmol) con las excepciones de Boc-Asn-OH y Boc-Gln-OH que se acoplan con sus ésteres de HOBt formados previamente.

Con el fin de escindir el péptido de la resina y desprotegerlo, se agita una parte de 600 mg del péptido-resina seco con 0,6 ml de m-cresol y 6 ml de fluoruro de hidrógeno (HF) a 0°C durante 2 horas. Tras la evaporación del HF bajo una corriente de nitrógeno y a vacío, se lava el residuo con dietil éter y acetato de etilo secos. Se disuelve el péptido escindido y desprotegido en ácido acético al 50% y se separa de la resina mediante filtración. Tras la dilución con agua y liofilización, se obtienen 141 mg de producto bruto.

Se comprueba el péptido bruto mediante HPLC analítica usando un cromatógrafo de líquidos de Hewlett-Packard modelo HP-1090 con una columna de fase inversa Discovery HS C18 de Supelco (2,1 mm x 5 cm, rellena con gel de sílice C18, tamaño de poro de 120 Å, tamaño de partícula de 3 µm) (Supelco, Bellefonte, PA) y elución en gradiente lineal (por ejemplo, el 40-70% de B), con un sistema de disolventes que consiste en (A) TFA al 0,1% acuoso y (B) TFA al 0,1% en MeCN al 70% acuoso. Para la purificación mediante HPLC semipreparativa, se disuelven 141 mg de péptido bruto en AcOH/H₂O, se agita, se filtra y se aplica en una columna Ultraprep ODS de Beckman (21,2 mm x 15 cm, rellena con gel de sílice C18, tamaño de poro de 300 Å, tamaño de partícula de 10 µm). Se eluye la columna con un sistema de disolventes descrito anteriormente en un modo de gradiente lineal (por ejemplo, el 40-60% de B en 120 min); velocidad de flujo de 12 ml/min. Se monitoriza el eluyente a 220 nm y se examinan las fracciones mediante HPLC analítica. Se reúnen las fracciones con pureza superior al 95% y se liofilizan para dar 12,9 mg de producto puro. Se lleva a cabo la HPLC analítica en una columna de fase inversa C18 de Supelco descrita anteriormente usando elución isocrática con un sistema de disolventes descrito anteriormente con una velocidad de flujo de 0,2 ml/min. Se monitorizan los picos a 220 y 280 nm. Se considera que el producto es sustancialmente puro (>95%) mediante HPLC analítica. Se comprueba la masa molecular mediante espectrometría de masas por electropulverización y se confirma la composición de aminoácidos esperada mediante análisis de aminoácidos.

Según el procedimiento anterior se sintetizan el Péptido 121302, Péptido 121303, Péptido 121304, Péptido 121305, Péptido 121306, Péptido 121307 y Péptido 121308 de la misma manera que el Péptido 121301, excepto porque estos péptidos también contienen otras sustituciones de aminoácidos en el péptido. A continuación se exponen los detalles para estas síntesis.

Para la síntesis del Péptido 121302, cuya estructura química es [PhAc-Ada⁰-Tyr¹, D-Arg², Cpa⁶, Ala⁸, Har⁹, (3,4,5-trifluoro-Phe)¹⁰, His¹¹, Orn¹², His¹⁵, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹, Har³⁰]hGH-RH(1-30)NH₂, se acoplan los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina de MBHA: Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Gln-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-(3,4,5-trifluoro)-Phe-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Cpa-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por acilación con PhAc-Ada-OH.

Para la síntesis del Péptido 121303, cuya estructura química es [PhAc-Ada⁰-Tyr¹, D-Arg², Cpa⁶, Ala⁸, Har⁹, Fpa⁵¹⁰, His¹¹, Orn¹², Abu¹⁵, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹, Har³⁰]hGH-RH(1-30)NH₂, se acoplan los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina de MBHA: Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Abu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Cpa-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por acilación con PhAc-Ada-OH.

Para la síntesis del Péptido 121304, cuya estructura química es [PhAc-Ada⁰-Tyr¹, D-Arg², Cpa⁶, Ala⁸, Har⁹, (3,4,5-trifluoro)-Phe¹⁰, His¹¹, Orn¹², Abu¹⁵, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹, Har³⁰]hGH-RH(1-30)NH₂, se acoplan los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina de MBHA: Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Abu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-(3,4,5-trifluoro)-Phe-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Cpa-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por acilación con PhAc-Ada-OH.

Para la síntesis del Péptido 121305, cuya estructura química es [PhAc-Ada⁰-Tyr¹, D-Arg², Fpa⁵⁶, Ala⁸, Har⁹, Fpa⁵¹⁰, His¹¹, Orn¹², His¹⁵, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹, Har³⁰]hGH-RH(1-30)NH₂, se acoplan los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina de MBHA: Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Gln-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por acilación con PhAc-Ada-OH.

EJEMPLO VI

PhAc-Ada⁰-Tyr¹-D-Arg²-Asp³-Ala⁴-Ile⁵-Cpa⁶-Trh⁷-Ala⁸-Har⁹-Fpa⁵¹⁰-His¹¹-Orn¹²-Val¹³-Leu¹⁴-His¹⁵-Gln¹⁶-Leu¹⁷-Ser¹⁸-Ala¹⁹-His²⁰-Orn²¹-Leu²²-Leu²³-Gln²⁴-Asp²⁵-Ile²⁶-Nle²⁷-D-Arg²⁸-Har²⁹-D-Arg³⁰-NH₂ (Péptido 121309)

[PhAc-Ada⁰-Tyr¹, D-Arg², Cpa⁶, Ala⁸, Har⁹, Fpa⁵¹⁰, His¹¹, Orn¹², His¹⁵, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹, D-Arg³⁰]hGH-RH(1-30)NH₂

Se realiza la síntesis de manera gradual usando equipo de síntesis de péptidos en fase sólida manual. Brevemente, se neutraliza resina de para-metilbenzidrilamina (MBHA) (Bachem, King of Prussia, PA) (720 mg, 0,50 mmol) con DIEA al 5% en DCM y se lava según el protocolo descrito en la tabla I. Se agita la disolución de Boc-D-Arg(Tos)-OH (643 mg, 1,5 mmol) en DMF con la resina neutralizada y DIC (235 µl, 1,5 mmol) en un aparato de síntesis de péptidos en fase sólida manual durante 1,5 horas. Una vez demostrado que se ha completado la reacción de acoplamiento mediante prueba de ninhidrina negativa, se realizan los protocolos de desprotección y neutralización descritos en la tabla I con el fin de retirar el grupo protector Boc y preparar el péptido-resina para el acoplamiento del siguiente aminoácido. Se continúa la síntesis y se construye la cadena peptídica gradualmente mediante el acoplamiento de los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina para obtener la secuencia peptídica deseada: Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Gln-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Cpa-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por acilación con PhAc-Ada-OH.

Estos residuos de aminoácido protegidos (también disponibles comúnmente de Bachem, Novabiochem, Advanced

Chemtech y Peptides International) se han representado anteriormente según un convenio bien aceptado. El grupo protector adecuado para el grupo funcional de cadena lateral de aminoácidos particulares aparece entre paréntesis. Los grupos OH en las fórmulas anteriores indican que el extremo carboxilo terminal de cada residuo está libre.

- 5 Se acoplan los aminoácidos protegidos (1,5 mmol cada uno) con DIC (235 μ l, 1,5 mmol) con las excepciones de Boc-Asn-OH y Boc-Gln-OH que se acoplan con sus ésteres de HOBt formados previamente.

10 Con el fin de escindir el péptido de la resina y desprotegerlo, se agita una parte de 600 mg del péptido-resina seco con 0,6 ml de m-cresol y 6 ml de fluoruro de hidrógeno (HF) a 0°C durante 2 horas. Tras la evaporación del HF bajo una corriente de nitrógeno y a vacío, se lava el residuo con dietil éter y acetato de etilo secos. Se disuelve el péptido escindido y desprotegido en ácido acético al 50% y se separa de la resina mediante filtración. Tras la dilución con agua y liofilización, se obtienen 146 mg de producto bruto.

15 Se comprueba el péptido bruto mediante HPLC analítica usando un cromatógrafo de líquidos de Hewlett-Packard modelo HP-1090 con una columna de fase inversa Discovery HS C18 de Supelco (2,1 mm x 5 cm, rellena con gel de sílice C18, tamaño de poro de 120 Å, tamaño de partícula de 3 μ m) (Supelco, Bellefonte, PA) y elución en gradiente lineal (por ejemplo, el 40-70% de B), con un sistema de disolventes que consiste en (A) TFA al 0,1% acuoso y (B) TFA al 0,1% en MeCN al 70% acuoso. Para la purificación mediante HPLC semipreparativa, se disuelven 146 mg de péptido bruto en AcOH/H₂O, se agita, se filtra y se aplica en una columna Ultraprep ODS de Beckman (21,2 mm x 20 15 cm, rellena con gel de sílice C18, tamaño de poro de 300 Å, tamaño de partícula de 10 μ m). Se eluye la columna con un sistema de disolventes descrito anteriormente en un modo de gradiente lineal (por ejemplo, el 40-60% de B en 120 min); velocidad de flujo de 12 ml/min. Se monitoriza el eluyente a 220 nm y se examinan las fracciones mediante HPLC analítica. Se reúnen las fracciones con pureza superior al 95% y se liofilizan para dar 15,6 mg de producto puro. Se lleva a cabo la HPLC analítica en una columna de fase inversa C18 de Supelco descrita 25 anteriormente usando elución isocrática con un sistema de disolventes descrito anteriormente con una velocidad de flujo de 0,2 ml/min. Se monitorizan los picos a 220 y 280 nm. Se considera que el producto es sustancialmente puro (>95%) mediante HPLC analítica. Se comprueba la masa molecular mediante espectrometría de masas por electropulverización y se confirma la composición de aminoácidos esperada mediante análisis de aminoácidos.

30 Según el procedimiento anterior se sintetizan el Péptido 121310, Péptido 121311, Péptido 121312, Péptido 121313, Péptido 121314, Péptido 121315 y Péptido 121316 de la misma manera que el Péptido 121309, excepto porque estos péptidos también contienen otras sustituciones de aminoácidos en la secuencia peptídica. A continuación se exponen los detalles para estas síntesis.

35 Para la síntesis del Péptido 121310, cuya estructura química es [PhAc-Ada⁰-Tyr¹, D-Arg², Cpa⁶, Ala⁸, Har⁹, (3,4,5-trifluoro-Phe)¹⁰, His¹¹, Orn¹², His¹⁵, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹, D-Arg³⁰]hGH-RH(1-30)NH₂, se acoplan los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina de MBHA: Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Gln-OH, Boc-His(Bom)-OH, 40 Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-(3,4,5-trifluoro-Phe)-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Cpa-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por acilación con PhAc-Ada-OH.

45 Para la síntesis del Péptido 121311, cuya estructura química es [PhAc-Ada⁰-Tyr¹, D-Arg², Cpa⁶, Ala⁸, Har⁹, Fpa⁵¹⁰, His¹¹, Orn¹², Abu¹⁵, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹, D-Arg³⁰]hGH-RH(1-30)NH₂, se acoplan los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina de MBHA: Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Abu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Fpa⁵-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, 50 Boc-Cpa-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por acilación con PhAc-Ada-OH.

55 Para la síntesis del Péptido 121312, cuya estructura química es [PhAc-Ada⁰-Tyr¹, D-Arg², Cpa⁶, Ala⁸, Har⁹, (3,4,5-trifluoro)-Phe¹⁰, His¹¹, Orn¹², Abu¹⁵, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹, D-Arg³⁰]hGH-RH(1-30)NH₂, se acoplan los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina de MBHA: Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Abu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-(3,4,5-trifluoro)-Phe-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, 60 Boc-Cpa-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por acilación con PhAc-Ada-OH.

65 Para la síntesis del Péptido 121313, cuya estructura química es [PhAc-Ada⁰-Tyr¹, D-Arg², Fpa⁵⁶, Ala⁸, Har⁹, Fpa⁵¹⁰, His¹¹, Orn¹², His¹⁵, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹, D-Arg³⁰]hGH-RH(1-30)NH₂, se acoplan los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina de MBHA: Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Gln-OH, Boc-His(Bom)-OH,

Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2CIZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por acilación con PhAc-Ada-OH.

5 EJEMPLO VII

PhAc-Ada⁰-Tyr¹-D-Arg²-Asp³-Ala⁴-Ile⁵-Cpa⁶-Trh⁷-Ala⁸-Har⁹-Fpa5¹⁰-His¹¹-Orn¹²-Val¹³-Leu¹⁴-His¹⁵-Gln¹⁶-Leu¹⁷-Ser¹⁸-Ala¹⁹-His²⁰-Orn²¹-Leu²²-Leu²³-Gln²⁴-Asp²⁵-Ile²⁶-Nle²⁷-D-Arg²⁸-Har²⁹-Apa³⁰-NH₂ (Péptido 121317)

10 [PhAc-Ada⁰-Tyr¹, D-Arg², Cpa⁶, Ala⁸, Har⁹, Fpa5¹⁰, His¹¹, Orn¹², His¹⁵, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹, Apa³⁰]hGH-RH(1-30)NH₂

Se realiza la síntesis de manera gradual usando equipo de síntesis de péptidos en fase sólida manual. Brevemente, se neutraliza resina de para-metilbenzidrilamina (MBHA) (Bachem, King of Prussia, PA) (720 mg, 0,50 mmol) con DIEA al 5% en DCM y se lava según el protocolo descrito en la tabla I. Se agita la disolución de Boc-Apa-OH (376 mg, 1,5 mmol) en DMF con la resina neutralizada y DIC (235 µl, 1,5 mmol) en un aparato de síntesis de péptidos en fase sólida manual durante 1,5 horas. Una vez demostrado que se ha completado la reacción de acoplamiento mediante prueba de ninhidrina negativa, se realizan los protocolos de desprotección y neutralización descritos en la tabla I con el fin de retirar el grupo protector Boc y preparar el péptido-resina para el acoplamiento del siguiente aminoácido. Se continúa la síntesis y se construye la cadena peptídica gradualmente mediante el acoplamiento de los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina para obtener la secuencia peptídica deseada: Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Orn(2CIZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Gln-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2CIZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Fpa5-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Cpa-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por acilación con PhAc-Ada-OH.

Estos residuos de aminoácido protegidos (también disponibles comúnmente de Bachem, Novabiochem, Advanced Chemtech y Peptides International) se han representado anteriormente según un convenio bien aceptado. El grupo protector adecuado para el grupo funcional de cadena lateral de aminoácidos particulares aparece entre paréntesis. Los grupos OH en las fórmulas anteriores indican que el extremo carboxilo terminal de cada residuo está libre.

Se acoplan los aminoácidos protegidos (1,5 mmol cada uno) con DIC (235 µl, 1,5 mmol) con las excepciones de Boc-Asn-OH y Boc-Gln-OH que se acoplan con sus ésteres de HOBt formados previamente.

Con el fin de escindir el péptido de la resina y desprotegerlo, se agita una parte de 600 mg del péptido-resina seco con 0,6 ml de m-cresol y 6 ml de fluoruro de hidrógeno (HF) a 0°C durante 2 horas. Tras la evaporación del HF bajo una corriente de nitrógeno y a vacío, se lava el residuo con dietil éter y acetato de etilo secos. Se disuelve el péptido escindido y desprotegido en ácido acético al 50% y se separa de la resina mediante filtración. Tras la dilución con agua y liofilización, se obtienen 132 mg de producto bruto.

Se comprueba el péptido bruto mediante HPLC analítica usando un cromatógrafo de líquidos de Hewlett-Packard modelo HP-1090 con una columna de fase inversa Discovery HS C18 de Supelco (2,1 mm x 5 cm, rellena con gel de sílice C18, tamaño de poro de 120 Å, tamaño de partícula de 3 µm) (Supelco, Bellefonte, PA) y elución en gradiente lineal (por ejemplo, el 40-70% de B), con un sistema de disolventes que consiste en (A) TFA al 0,1% acuoso y (B) TFA al 0,1% en MeCN al 70% acuoso. Para la purificación mediante HPLC semipreparativa, se disuelven 132 mg de péptido bruto en AcOH/H₂O, se agita, se filtra y se aplica en una columna Ultraprep ODS de Beckman (21,2 mm x 15 cm, rellena con gel de sílice C18, tamaño de poro de 300 Å, tamaño de partícula de 10 µm). Se eluye la columna con un sistema de disolventes descrito anteriormente en un modo de gradiente lineal (por ejemplo, el 40-60% de B en 120 min); velocidad de flujo de 12 ml/min. Se monitoriza el eluyente a 220 nm y se examinan las fracciones mediante HPLC analítica. Se reúnen las fracciones con pureza superior al 95% y se liofilizan para dar 11,2 mg de producto puro. Se lleva a cabo la HPLC analítica en una columna de fase inversa C18 de Supelco descrita anteriormente usando elución isocrática con un sistema de disolventes descrito anteriormente con una velocidad de flujo de 0,2 ml/min. Se monitorizan los picos a 220 y 280 nm. Se considera que el producto es sustancialmente puro (>95%) mediante HPLC analítica. Se comprueba la masa molecular mediante espectrometría de masas por electropulverización y se confirma la composición de aminoácidos esperada mediante análisis de aminoácidos.

Según el procedimiento anterior se sintetizan el Péptido 121318, Péptido 121319, Péptido 121320, Péptido 121321, Péptido 121322, Péptido 121323 y Péptido 121324 de la misma manera que el Péptido 121317, excepto porque estos péptidos también contienen otras sustituciones de aminoácidos en el péptido. A continuación se exponen los detalles para estas síntesis.

Para la síntesis del Péptido 121318, cuya estructura química es [PhAc-Ada⁰-Tyr¹, D-Arg², Cpa⁶, Ala⁸, Har⁹, (3,4,5-trifluoro-Phe)¹⁰, His¹¹, Orn¹², His¹⁵, His²⁰, Orn²¹, Nle²⁷, D-Arg²⁸, Har²⁹, Apa³⁰]hGH-RH(1-30)NH₂, se acoplan los siguientes aminoácidos protegidos en el orden indicado en la resina de MBHA: Boc-Apa-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Leu-OH, Boc-

Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Gln-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Val-OH, Boc-Orn(2ClZ)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-(3,4,5-trifluoro)-Phe-OH, Boc-Har(NO₂)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Cpa-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, seguido por acilación con PhAc-Ada-OH.

5 EJEMPLO VIII

Disolución acuosa para inyección intramuscular

[PhAc ⁰ -Tyr ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , Abu ¹⁵ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹ , Ada ³⁰]hGH-RH(1-30)NH ₂ (Péptido 12640)	500,0 mg
Gelatina, no antigénica	5,0 mg
Agua para inyección, c.s.p.	hasta 100,0 ml

Se disuelven la gelatina y el Péptido 12640 antagonista de GH-RH en agua para inyección, y entonces se filtra la disolución en condiciones estériles.

15 EJEMPLO IX

Formulación inyectable intramuscular de acción prolongada (gel de aceite de sésamo)

[(PhF ₅ Ac-Ada) ⁰ -Tyr ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , Abu ¹⁵ , Glu ¹⁷ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹]hGH-RH(1-29)NH ₂ (Péptido 12692)	10,0 mg
Monoestearato de aluminio, USP	20,0 mg
Aceite de sésamo, c.s.p.	hasta 1,0 ml

Se combina el monoestearato de aluminio con el aceite de sésamo y se calienta hasta 125°C con agitación hasta que se forma una disolución de color amarillo claro. Entonces se somete esta mezcla a autoclave para su esterilización y se deja enfriar. Entonces se añade asépticamente el Péptido 12692 antagonista de GH-RH con trituración. Antagonistas particularmente preferidos son sales de baja solubilidad, por ejemplo, sales de pamoato y similares. Éstas presentan larga duración de actividad.

25 EJEMPLO X

Microcápsulas de polímero biodegradables-inyectables intramusculares (i.m.) de acción prolongada

Las microcápsulas están compuestas por lo siguiente:

Copolímero de glicolida/lactida 25/75 (viscosidad intrínseca de 0,5)	99%
[PhAc ⁰ -Tyr ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , (Me-Ala) ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , His ¹⁵ , Glu ¹⁷ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹ , Ada ³⁰]hGH-RH(1-30)OH (Péptido 12852)	1%

Se suspenden 25 mg de las microcápsulas anteriores en 1,0 ml del vehículo siguiente:

Dextrosa	5,0%
CMC, de sodio	0,5%
Alcohol bencílico	0,9%
Tween 80	0,1%
Agua, purificada, c.s.p.	hasta el 100%

35 EJEMPLO XI

Actividad biológica en ensayos endocrinos y oncológicos

Se sometieron a prueba los péptidos de la presente invención en ensayos *in vitro* e *in vivo* para determinar su capacidad para inhibir la liberación de GH inducida por hGH-RH(1-29)NH₂. También se midieron las afinidades de unión de los compuestos a los receptores de GH-RH tumorales. Se evaluaron las actividades antitumorales de los péptidos y sus efectos inhibidores sobre IGF-I en suero y sobre el sistema de IGF, VEGF y FGF tumoral en diversos modelos de cáncer *in vivo*. También se midieron los efectos inhibidores sobre PI3K/AKT y MAPK (ERK1/2) fosforiladas.

Efecto de antagonistas de GH-RH sobre xenoinjertos de cáncer de próstata humano PC-3 en ratones atímicos

Se implantaron por vía s.c. a ratones atímicos macho fragmentos de 3 mm³ de tejido de cáncer de próstata independiente de hormonas humano PC-3 en ambos costados. Cuando los tumores alcanzaron un volumen de aproximadamente 50 mm³, se dividió a los ratones en dos grupos experimentales con de 8 a 10 animales en cada

grupo y recibieron inyecciones diarias únicas durante 28 días tal como sigue: 1. Control (disolución de vehículo); 2. Péptido 12640 (2 µg/día por vía s.c.). Se midieron los volúmenes tumorales una vez a la semana. Se terminó el experimento en el día 28 sacrificando a los ratones bajo anestesia con isoflurano. Se limpiaron los tumores resultantes, se pesaron y se congelaron instantáneamente hasta los análisis adicionales. Se realizaron análisis estadísticos de los resultados de medición mediante la prueba de la t bilateral, considerándose significativo $p < 0,05$.

Resultados

El Péptido 12640, sometido a prueba a la dosis de 2 µg/día, inhibió fuertemente el crecimiento de los tumores PC-3. El efecto inhibitor ya fue significativo ($p < 0,05$) y superó el 50% tras la primera semana de tratamiento. La inhibición tumoral fue altamente significativa ($p < 0,001$) al final del experimento, siendo el grado de inhibición tumoral de aproximadamente el 80%. Los resultados se muestran en la tabla III.

Tabla III.

Efecto del tratamiento con P-12640 antagonista de GH-RH en xenoinjertos de cáncer de próstata humano PC-3 en ratones atímicos

Grupo de tratamiento	Crecimiento tumoral (%)				
	0	7	14	21	28 días
Control	100	331,28	590,95	1190,10	1857,23
P-12640, 2 µg/día	100	140,03	227,88	288,92	376,77

Grupo de tratamiento	Inhibición tumoral (%)				
	0	7	14	21	28 días
P-12640, 2 µg/día	0	57,73	61,44	75,72	79,71

Efecto de antagonistas de GH-RH sobre xenoinjertos de linfoma humano HT en ratones atímicos

El objetivo de este estudio fue averiguar el efecto inhibitor tumoral de P-12640 a una dosis baja de 5 µg/día sobre la línea celular de linfoma difuso mixto de células B humano HT *in vivo*. Se implantaron xenoinjertos por vía subcutánea en ratones atímicos hembra de fragmentos de aproximadamente 3 mm³ de tejido tumoral maligno HT. Cuando los tumores alcanzaron el volumen medio de aproximadamente 120 mm³, se dividió a los ratones en dos grupos experimentales con 7 animales en cada grupo y recibieron inyecciones diarias únicas durante 28 días tal como sigue: 1. Control (disolución de vehículo); 2. Péptido 12640 (5 µg/día por vía s.c.). Se midieron los volúmenes tumorales y el peso corporal una vez a la semana. Se terminó el experimento en el día 28 sacrificando a los ratones bajo anestesia con isoflurano. Se limpiaron los tumores resultantes, se pesaron y se congelaron instantáneamente hasta los análisis adicionales. Se realizaron análisis estadísticos de los resultados de medición mediante la prueba de la t bilateral, considerándose significativo $p < 0,05$.

Resultados

El Péptido 12640, sometido a prueba a la dosis de 5 µg/día, inhibió significativamente ($p < 0,05$) el crecimiento de linfomas humanos HT en ratones atímicos en más del 40% al final del experimento. Los resultados se muestran en la tabla IV.

TABLA IV. Efecto del tratamiento con P-12640 antagonista de GH-RH sobre xenoinjertos de linfoma humano HT en ratones atímicos

Grupo de tratamiento	Crecimiento tumoral (%)				
	0	7	14	21	28 días
Control	100	305,66	482,84	781,55	896,53
P-12640, 5 µg/día	100	197,57	358,78	385,53	532,84

Grupo de tratamiento	Inhibición tumoral (%)				
	0	7	14	21	28 días
P-12640, 5 µg/día	0	35,36	25,69	50,67	40,56

Efecto de antagonistas de GH-RH sobre xenoinjertos de cáncer de mama humano MDA-MB-435 en ratones atímicos

Se implantaron xenoinjertos por vía s.c. en ratones atímicos hembra de fragmentos de 3 mm³ de tejido de cáncer de mama independiente de estrógenos humano MDA-MB-435 procedente de animales donantes. Cuando los tumores habían crecido hasta un volumen medio de aproximadamente 100 mm³, se dividió a los ratones en dos grupos experimentales con 8 animales en cada grupo y recibieron inyecciones diarias únicas durante 28 días tal como sigue: 1. Control (disolución de vehículo); 2. Péptido 12640 (5 µg/día por vía s.c.). Se midieron los volúmenes

tumorales semanalmente. Se terminó el experimento en el día 28 sacrificando a los ratones bajo anestesia con isoflurano. Se limpiaron los tumores recogidos, se pesaron y se sumergieron en disolución de estabilización de proteínas y ácidos nucleicos para evitar la degradación hasta que se realizan los análisis. Se realizó el análisis estadístico de los datos usando ANOVA, considerándose significativo $p < 0,05$.

Resultados

El Péptido 12640, sometido a prueba a la dosis de 5 $\mu\text{g}/\text{día}$, inhibió significativamente ($p < 0,01$) el crecimiento de tumores MDA-MB-435 en aproximadamente el 60% tras cuatro semanas de tratamiento. El efecto inhibitor llegó a ser significativo ($p < 0,05$) tras 2 semanas de tratamiento, y siguió siendo significativo ($p < 0,01$) durante el resto del estudio. Los resultados se muestran en la tabla V.

TABLA V.

Efecto del tratamiento con P-12640 antagonista de GH-RH sobre xenoinjertos de cáncer de mama humano MDA-MB-435 en ratones atímicos

Grupo de tratamiento	Inhibición tumoral (%)				
	0	1	2	3	4 semanas
P-12640, 5 $\mu\text{g}/\text{día}$	0	22,96	45,48	58,62	60,38

Efecto de antagonistas de GH-RH sobre xenoinjertos de cáncer de mama independiente de estrógenos humano MX-1 en ratones atímicos

Se implantaron xenoinjertos por vía s.c. en ratones atímicos hembra de fragmentos de 3 mm^3 de tejido de cáncer de mama independiente de estrógenos humano MX-1 procedente de animales donantes. Cuando los tumores habían crecido hasta un volumen medio de aproximadamente 350 mm^3 , se dividió a los ratones en 3 grupos experimentales con 10 animales en cada grupo y recibieron inyecciones diarias únicas durante 28 días tal como sigue: 1. Control (disolución de vehículo); 2. Péptido 12690 (5 $\mu\text{g}/\text{día}$ por vía s.c.); 3. Péptido 12880 (5 $\mu\text{g}/\text{día}$ por vía s.c.). Se midieron los volúmenes tumorales semanalmente. Se terminó el experimento en el día 28 sacrificando a los ratones bajo anestesia con isoflurano. Se limpiaron los tumores recogidos, se pesaron y se sumergieron en disolución de estabilización de proteínas y ácidos nucleicos para evitar la degradación hasta que se realizan los análisis. Se realizó el análisis estadístico de los datos usando ANOVA, considerándose significativo $p < 0,05$.

Resultados

Ambos Péptidos P-12690 y P-12880, sometidos a prueba a la dosis de 5 $\mu\text{g}/\text{día}$, inhibieron significativamente ($p < 0,001$) el crecimiento de tumores MX-1 en aproximadamente el 55% tras cuatro semanas de tratamiento. Los efectos inhibidores de ambos péptidos llegaron a ser significativos ($p < 0,01$) tras sólo 1 semana de tratamiento. Los efectos de ambos P-12690 y P-12880 fueron altamente significativos ($p < 0,001$) tras 2 semanas, y siguieron siendo altamente significativos ($p < 0,001$) durante el resto del estudio. Los resultados se muestran en la tabla VI.

TABLA VI.

Efecto del tratamiento con antagonistas de GH-RH sobre xenoinjertos de cáncer de mama humano MX-1 en ratones atímicos

Grupo de tratamiento	Inhibición tumoral (%)				
	0	1	2	3	4 semanas
P-12690, 5 $\mu\text{g}/\text{día}$	0	26,18	38,28	42,52	55,31
P-12880, 5 $\mu\text{g}/\text{día}$	0	16,81	28,87	45,50	55,33

Efecto de antagonistas de GH-RH sobre carcinomas de células renales humanos ACHN implantados como xenoinjertos en ratones atímicos

Se implantaron por vía s.c. a ratones atímicos macho fragmentos de 3 mm^3 de tejido canceroso de carcinoma de células renales humano ACHN en ambos costados. Cuando los tumores alcanzaron un volumen de aproximadamente 50 mm^3 , se dividió a los ratones en 3 grupos experimentales con 8 animales en cada grupo y recibieron inyecciones diarias únicas durante 35 días tal como sigue: 1. Control (disolución de vehículo); 2. Péptido 12690 (5 $\mu\text{g}/\text{día}$ por vía s.c.); 3. JMR-132 (antagonista de referencia) (10 $\mu\text{g}/\text{día}$ por vía s.c.). Se midieron los volúmenes tumorales una vez a la semana. Se terminó el experimento en el día 35 sacrificando a los ratones bajo anestesia con isoflurano. Se limpiaron los tumores resultantes, se pesaron y se congelaron instantáneamente hasta los análisis adicionales. Se realizaron análisis estadísticos de los resultados de medición mediante la prueba de la t bilateral, considerándose significativo $p < 0,05$.

Resultados

El Péptido 12690, sometido a prueba a la dosis de 5 µg/día, inhibió fuertemente el crecimiento de tumores ACHN en aproximadamente el 70% tras 5 semanas. El efecto inhibitor de P-12690 fue altamente significativo ($p<0,001$) al final del experimento. El antagonista de referencia JMR-132, sometido a prueba a la dosis doble de 10 µg/día, también inhibió el crecimiento tumoral, pero su efecto fue más débil que el de P-12690 a 5 µg/día. Los resultados se muestran en la tabla VII.

TABLA VII.

Efecto del tratamiento con antagonistas de GH-RH sobre xenoinjertos de carcinoma de células renales humano ACHN en ratones atímicos			
Grupo de tratamiento	Crecimiento tumoral tras 5 semanas (%)	Inhibición del crecimiento tumoral tras 5 semanas (%)	Significancia frente al control
Control	806,98	--	--
P-12690, 5 µg/día	246,92	69,40	$p<0,001$
JMR-132, 10 µg/día	425,74	47,24	$p<0,05$

10 Efecto de antagonistas de GH-RH sobre carcinomas de células renales humanas A-498 implantados como xenoinjertos en ratones atímicos

Se implantaron por vía s.c. a ratones atímicos macho fragmentos de 3 mm³ de tejido canceroso de carcinoma de células renales humano A-498 en ambos costados. Cuando los tumores alcanzaron un volumen de aproximadamente 50 mm³, se dividió a los ratones en 3 grupos experimentales con 8 animales en cada grupo y recibieron inyecciones diarias únicas durante 35 días tal como sigue: 1. Control (disolución de vehículo); 2. Péptido 12690 (5 µg/día por vía s.c.); 3. JMR-132 (antagonista de referencia) (10 µg/día por vía s.c.). Se midieron los volúmenes tumorales una vez a la semana. Se terminó el experimento en el día 35 sacrificando a los ratones bajo anestesia con isoflurano. Se limpiaron los tumores resultantes, se pesaron y se congelaron instantáneamente hasta los análisis adicionales. Se realizaron análisis estadísticos de los resultados de medición mediante la prueba de la t bilateral, considerándose significativo $p<0,05$.

Resultados

El péptido 12690, sometido a prueba a la dosis de 5 µg/día, inhibió fuertemente el crecimiento de tumores A-498 en casi el 70% tras 5 semanas. El efecto inhibitor de P-12690 fue altamente significativo ($p<0,01$) al final del experimento. El antagonista de referencia JMR-132, sometido a prueba a la dosis doble de 10 µg/día, sólo produjo una inhibición débil y no significativa del crecimiento del tumor A-498. Los resultados se muestran en la tabla VIII.

TABLA VIII.

Efecto del tratamiento con antagonistas de GH-RH sobre xenoinjertos de carcinoma de células renales humano A-498 en ratones atímicos			
Grupo de tratamiento	Crecimiento tumoral tras 5 semanas (%)	Inhibición del crecimiento tumoral tras 5 semanas (%)	Significancia frente al control
Control	840,70	--	--
P-12690, 5 µg/día	268,23	68,10	$p<0,01$
JMR-132, 10 µg/día	611,31	27,29	N.S.

N.S., no significativo

35 Efecto de antagonistas de GH-RH sobre carcinomas de células renales humanos 786-0 implantados como injertos en ratones atímicos

Se implantaron por vía s.c. a ratones atímicos macho fragmentos de 3 mm³ de tejido canceroso de carcinoma de células renales humano 786-0 en ambos costados. Cuando los tumores alcanzaron un volumen de aproximadamente 50 mm³, se dividió a los ratones en 3 grupos experimentales con 8 animales en cada grupo y recibieron inyecciones diarias únicas durante 35 días tal como sigue: 1. Control (disolución de vehículo); 2. Péptido 12690 (5 µg/día por vía s.c.); 3. JMR-132 (antagonista de referencia) (10 µg/día por vía s.c.). Se midieron los volúmenes tumorales una vez a la semana. Se terminó el experimento en el día 35 sacrificando a los ratones bajo anestesia con isoflurano. Se limpiaron los tumores resultantes, se pesaron y se congelaron instantáneamente hasta los análisis adicionales. Se realizaron análisis estadísticos de los resultados de medición mediante la prueba de la t bilateral, considerándose significativo $p<0,05$.

Resultados

El Péptido 12690, sometido a prueba a la dosis de 5 µg/día, inhibió fuertemente el crecimiento de tumores 786-0 en más del 63% tras 5 semanas. El efecto inhibitor de P-12690 fue altamente significativo ($p<0,001$) al final del

experimento. El antagonista de referencia JMR-132, sometido a prueba a la dosis doble de 10 µg/día, sólo produjo una inhibición más débil y menos significativa en el crecimiento de carcinomas de células renales 786-0 que P-12690 a 5 µg/día. Los resultados se muestran en la tabla IX.

5

TABLA IX.

<u>Efecto del tratamiento con antagonistas de GH-RH sobre xenoinjertos de carcinoma de células renales humano 786-0 en ratones atímicos</u>			
Grupo de tratamiento	Crecimiento tumoral tras 5 semanas (%)	Inhibición del crecimiento tumoral tras 5 semanas (%)	Significancia frente al control
Control	1146,36	--	--
P-12690, 5 µg/día	416,42	63,67	p<0,001
JMR-132, 10 µg/día	658,77	42,53	p<0,05

Efecto de antagonistas de GH-RH sobre xenoinjertos de melanoma humano G361 en ratones atímicos

- 10 El objetivo de este estudio fue averiguar el efecto inhibitor tumoral de P-12690 a una dosis baja de 5 µg/día sobre la línea celular de melanoma humano G361 *in vivo*. Se implantaron xenoinjertos por vía subcutánea en ratones atímicos hembra de fragmentos de aproximadamente 3 mm³ de tejido tumoral maligno G361. Cuando los tumores alcanzaron un volumen de aproximadamente 60-80 mm³, se dividió a los ratones en dos grupos experimentales con 6 animales en cada grupo y recibieron inyecciones diarias únicas durante 42 días tal como sigue: 1. Control
- 15 (disolución de vehículo); 2. Péptido 12690 (5 µg/día por vía s.c.). Se midieron los volúmenes tumorales y los pesos corporales una vez a la semana. Se terminó el experimento en el día 42 sacrificando a los ratones bajo anestesia con isoflurano. Se limpiaron los tumores resultantes, se pesaron y se congelaron instantáneamente hasta los análisis adicionales.

20 Resultados

Los tumores control crecieron de manera continua y alcanzaron un volumen medio de 1252,74 mm³ tras 42 días. El volumen medio de los tumores tratados con P-12690 fue de 585,23 mm³ tras 42 días de tratamiento, lo que corresponde a una inhibición del volumen tumoral mayor del 50% al final del experimento.

25

LISTA DE SECUENCIAS

<110> SCHALLY, ANDREW VARGA, JOZSEF ZARANDI, MARTA CAI, REN ZHI BLOCK, NORMAN L.

30 <120> ANTAGONISTAS DE GH-RH FLUORADOS

<130> SHAL3.0-036

<140> 12/562, 010

35 <141> 17-09-2009

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.5

40

<210> 1

<211> 29

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

45

<400> 1

Tyr Ala Asp Ala Ile Phe Thr Asn Ser Tyr Arg Lys Val Leu Gly Gln
1 5 10 15

Leu Ser Ala Arg Lys Leu Leu Gln Asp Ile Met Ser Arg
20 25

50

REIVINDICACIONES

1. Péptido seleccionado del grupo que tiene las fórmulas:

5 $[R_1-A^0, A^1, A^2, A^6, A^8, A^9, A^{10}, A^{11}, A^{12}, A^{13}, A^{15}, A^{17}, A^{19}, A^{20}, A^{21}, A^{22}, A^{23}, A^{27}, A^{28}, A^{29}, A^{30}] \text{ hGH-RH}(1-30)-R_2$

en las que

10 R_1 es PhAc, PhF₅Ac, CH₃(CH₂)₁₀CO, Ac, Tfa o Dca,

A^0 es Dca, PhAc, PhF₅Ac, (Dca-Ada), (CH₃-(CH₂)₁₀-CO-Ada), (Ac-Ada), (PhAc-Ada) o (PhF₅Ac-Ada) ω -Ada, Amc, o está ausente,

15 A^1 es L-Fpa, D-Fpa, Tyr, D-Tyr, His, D-His o Fpa5,

A^2 es D-Arg, D-Har, D-Cit o D-Amp,

20 A^6 es Fpa, Fpa5 o Cpa,

A^8 es Asn, D-Asn, Cit, D-Cit, Gln, D-Gln, Ser, D-Ser, Thr, D-Thr, Ala, D-Ala, N-Me-Ala, N-Me-D-Ala, Abu, D-Abu o Aib,

25 A^9 es Har, D-Har, Arg, D-Arg, Fpa, D-Fpa, His, D-His, Amp, D-Amp, Gup o D-Gup,

A^{10} es Phe di o polifluorada (en el anillo aromático), Fpa2, Fpa3, Fpa4 o Fpa5,

A^{11} es His, D-His, Arg, D-Arg, Cit, D-Cit, Har, D-Har, Amp, D-Amp, Gup o D-Gup,

30 A^{12} es Lys, D-Lys, Lys(Me)₂, Lys(iPr), Orn, D-Orn, Har, D-Har, Cit, D-Cit, Nle, D-Nle, Ala o D-Ala,

A^{13} es Fpa o Val,

35 A^{15} es Fpa, Gly, Ala, Abu, Aib, Nle, Gln, Cit o His,

A^{17} es Leu o Glu,

A^{19} es Ala o Abu,

40 A^{20} es His, D-His, Arg, D-Arg, Har, D-Har, Amp, D-Amp, Cit o D-Cit,

A^{21} es Lys, D-Lys, Lys(Me)₂, Lys(iPr), Orn, D-Orn, Har, D-Har, Cit o D-Cit,

45 A^{22} es Fpa, Leu, Tyr, Ala o Aib,

A^{23} es Fpa, Leu, Tyr, Ala o Aib,

A^{27} es Nle, Met, Leu, Ala, Abu, α -Apa, α -Ahea o α -Aoc,

50 A^{28} es Arg, D-Arg, Har, D-Har, Ser, Asn, Asp, Ala, Abu o Cit,

A^{29} es Arg, D-Arg, Har o Agm,

55 A^{30} es Arg, Ada, D-Arg, Har, Agm, o está ausente,

R_2 es -NH₂, u -OH,

siempre que cuando A^{17} es Leu y A^{30} es Ada, entonces A^{15} es distinto de Abu,

60 además siempre que si A^{29} es Agm entonces A^{30} y R_2 están ausentes, y si A^{30} es Agm entonces R_2 está ausente,

y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

65 2. Péptido según la reivindicación 1, en el que uno o más de los sustituyentes A^1 , A^6 y A^{10} son Fpa3, Fpa4, Fpa5 o 3,4,5-trifluoro-Phe y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

3. Péptido según la reivindicación 2, en el que uno o más de los sustituyentes A¹, A⁶ y A¹⁰ son o bien Fpa4 o bien Fpa5.

5 4. Péptido según la reivindicación 2, en el que el sustituyente en al menos un miembro del grupo que consiste en A¹, A⁶ o A¹⁰, es Fpa4 o Fpa5.

5. Péptido según la reivindicación 2, en el que:

10 R₁ es Ac, (Ac-Ada), PhAc y PhF₅Ac,

A¹ es Tyr o Fpa5,

A⁶ es Fpa5,

15 A⁸ es (Me-Ala),

A¹⁰ es Fpa5,

20 A¹⁵ es His,

A¹⁷ es Glu,

A³⁰ es Ada o Agm,

25 R₂ es -NH₂ u -OH.

6. Péptido según la reivindicación 1, seleccionado del grupo que tiene las fórmulas:

P-12610	[PhAc ⁰ -Tyr ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , Abu ¹⁵ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹ , Ada ³⁰]hGH-RH(1-30)NH ₂
P-12640	[PhAc ⁰ -Tyr ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , Abu ¹⁵ , Glu ¹⁷ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹ , Ada ³⁰]hGH-RH(1-30)NH ₂
P-12642	[PhAc ⁰ -Tyr ¹ , D-Arg ² , Fpa5 ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , Abu ¹⁵ , Glu ¹⁷ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹ , Ada ³⁰]hGH-RH(1-30)NH ₂
P-12644	[PhAc ⁰ -Tyr ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , (Me-Ala) ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , Abu ¹⁵ , Glu ¹⁷ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹ , Ada ³⁰]hGH-RH(1-30)NH ₂
P-12646	[(PhAc-Ada) ⁰ -Tyr ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , Abu ¹⁵ , Glu ¹⁷ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹]hGH-RH(1-29)NH ₂
P-12650	[(PhF ₅ Ac) ⁰ -Tyr ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , Abu ¹⁵ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹]hGH-RH(1-29)NH ₂
P-12652	[(PhF ₅ Ac) ⁰ -Tyr ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , Abu ¹⁵ , Glu ¹⁷ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹ , Ada ³⁰]hGH-RH(1-30)NH ₂
P-12654	[(PhF ₅ Ac) ⁰ -Tyr ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , His ¹⁵ , Glu ¹⁷ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹ , Ada ³⁰]hGH-RH(1-30)NH ₂
P-12656	[(PhF ₅ Ac) ⁰ -Tyr ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , (Me-Ala) ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , Abu ¹⁵ , Glu ¹⁷ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹ , Ada ³⁰]hGH-RH(1-30)NH ₂
P-12660	[PhAc ⁰ -Tyr ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , His ¹⁵ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹ , Ada ³⁰]hGH-RH(1-30)NH ₂
P-12662	[PhAc ⁰ -Tyr ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , His ¹⁵ , Glu ¹⁷ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹ , Ada ³⁰]hGH-RH(1-30)NH ₂
P-12664	[(PhF ₅ Ac) ⁰ -Tyr ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , (Me-Ala) ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , His ¹⁵ , Glu ¹⁷ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹ , Ada ³⁰]hGH-RH(1-30)NH ₂
P-12666	[(PhAc-Ada) ⁰ -Tyr ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , (Me-Ala) ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , His ¹⁵ , Glu ¹⁷ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹ , Ada ³⁰]hGH-RH(1-30)NH ₂
P-12670	[PhAc ⁰ -Tyr ¹ , D-Arg ² , Fpa5 ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , His ¹⁵ , Glu ¹⁷ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹ , Ada ³⁰]hGH-RH(1-30)NH ₂
P-12672	[(PhF ₅ Ac) ⁰ -Tyr ¹ , D-Arg ² , Fpa5 ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , Abu ¹⁵ , Glu ¹⁷ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹ , Ada ³⁰]hGH-RH(1-30)NH ₂
P-12674	[(PhF ₅ Ac) ⁰ -Tyr ¹ , D-Arg ² , Fpa5 ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , His ¹⁵ , Glu ¹⁷ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹ , Ada ³⁰]hGH-RH(1-30)NH ₂
P-12680	[(Ac-Ada) ⁰ -Tyr ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , Abu ¹⁵ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹]hGH-RH(1-29)NH ₂
P-12682	[(Ac-Ada) ⁰ -Tyr ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , His ¹⁵ , Glu ¹⁷ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹]hGH-RH(1-29)NH ₂

P-12684	[(Ac-Ada) ⁰ -Tyr ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , (Me-Ala) ⁸ -Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , His ¹⁵ , Glu ¹⁷ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹]hGH-RH(1-29)NH ₂
P-12690	[(PhAc-Ada) ⁰ -Tyr ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , Abu ¹⁵ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹]hGH-RH(1-29)NH ₂
P-12692	[(PhF ₅ Ac-Ada) ⁰ -Tyr ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , Abu ¹⁵ , Glu ¹⁷ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹]hGH-RH(1-29)NH ₂
P-12694	[(PhAc-Ada) ⁰ -Tyr ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , (Me-Ala) ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , Abu ¹⁵ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹]hGH-RH(1-29)NH ₂
P-12696	[(PhAc-Ada) ⁰ -Tyr ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , (Me-Ala) ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , His ¹⁵ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹]hGH-RH(1-29)NH ₂
P-12698	[(PhAc-Ada) ⁰ -Tyr ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , (Me-Ala) ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , His ¹⁵ , Glu ¹⁷ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹]hGH-RH(1-29)NH ₂
P-12710	[(PhAc-Ada) ⁰ -Tyr ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , His ¹⁵ , Glu ¹⁷ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹]hGH-RH(1-29)NH ₂
P-12712	[(PhAc-Ada) ⁰ -Tyr ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Leu ¹³ , Orn ¹² , Abu ¹⁵ , Glu ¹⁷ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹]hGH-RH(1-29)NH ₂
P-12714	[PhF ₅ Ac ⁰ -Tyr ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Leu ¹³ , Orn ¹² , Abu ¹⁵ , Glu ¹⁷ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹]hGH-RH(1-29)NH ₂
P-12716	[(PhF ₅ Ac-Ada) ⁰ -Tyr ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , (Me-Ala) ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , His ¹⁵ , Glu ¹⁷ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹]hGH-RH(1-29)NH ₂
P-12720	[(CH ₃ -(CH ₂) ₁₀ -CO-Ada) ⁰ -Tyr ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , (Me-Ala) ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , Abu ¹⁵ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹]hGH-RH(1-29)NH ₂
P-12730	[(PhAc-Ada) ⁰ -Tyr ¹ , D-Arg ² , Fpa5 ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , Abu ¹⁵ , Glu ¹⁷ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹]hGH-RH(1-29)NH ₂
P-12740	[(PhAc-Ada) ⁰ -Tyr ¹ , D-Arg ² , Fpa5 ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , Abu ¹⁵ , Glu ¹⁷ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹ , Ada ³⁰]hGH-RH(1-30)NH ₂
P-12750	[(PhAc-Ada) ⁰ -Tyr ¹ , D-Arg ² , Fpa5 ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , His ¹⁵ , Glu ¹⁷ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹]hGH-RH(1-29)NH ₂
P-12760	[(CH ₃ -(CH ₂) ₁₀ -CO-Ada) ⁰ -Tyr ¹ , D-Arg ² , Fpa5 ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , Abu ¹⁵ , Glu ¹⁷ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹]hGH-RH(1-29)NH ₂
P-12770	[(Ac-Ada) ⁰ -Tyr ¹ , D-Arg ² , Fpa5 ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , Abu ¹⁵ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹]hGH-RH(1-29)NH ₂
P-12780	[(PhF ₅ Ac-Ada) ⁰ -Tyr ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , (Me-Ala) ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , His ¹⁵ , Glu ¹⁷ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹ , Ada ³⁰]hGH-RH(1-30)NH ₂
P-12800	[(PhF ₅ Ac-Ada) ⁰ -Tyr ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , (Me-Ala) ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , His ¹⁵ , Glu ¹⁷ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹ , Agm ³⁰]hGH-RH(1-30)
P-12802	[(PhAc-Ada) ⁰ -Tyr ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , (Me-Ala) ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , His ¹⁵ , Glu ¹⁷ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹ , Agm ³⁰]hGH-RH(1-30)
P-12804	[(Ac-Ada) ⁰ -Tyr ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , (Me-Ala) ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , His ¹⁵ , Glu ¹⁷ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹ , Agm ³⁰]hGH-RH(1-30)
P-12806	[(CH ₃ -(CH ₂) ₁₀ -CO-Ada) ⁰ -Tyr ¹ , D-Arg ² , Cpa

P-12850	[PhF ₅ Ac ⁰ -Tyr ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , (Me-Ala) ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , His ¹⁵ , Glu ¹⁷ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹ , Ada ³⁰]hGH-RH(1-30)OH
P-12852	[PhAc ⁰ -Tyr ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , (Me-Ala) ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , His ¹⁵ , Glu ¹⁷ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹ , Ada ³⁰]hGH-RH(1-30)OH
P-12854	[Dca ⁰ -Tyr ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , (Me-Ala) ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , His ¹⁵ , Glu ¹⁷ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹ , Ada ³⁰]hGH-RH(1-30)OH
P-12860	[(PhF ₅ Ac-Ada) ⁰ -Tyr ¹ , D-Arg ² , Fpa5 ⁶ , (Me-Ala) ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , His ¹⁵ , Glu ¹⁷ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹ , Ada ³⁰]hGH-RH(1-30)OH
P-12862	[(PhAc-Ada) ⁰ -Tyr ¹ , D-Arg ² , Fpa5 ⁶ , (Me-Ala) ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , His ¹⁵ , Glu ¹⁷ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹ , Ada ³⁰]hGH-RH(1-30)OH
P-12864	[(Ac-Ada) ⁰ -Tyr ¹ , D-Arg ² , Fpa5 ⁶ , (Me-Ala) ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , His ¹⁵ , Glu ¹⁷ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹ , Ada ³⁰]hGH-RH(1-30)OH
P-12866	[(CH ₃ -(CH ₂) ₁₀ -CO-Ada) ⁰ -Tyr ¹ , D-Arg ² , Fpa5 ⁶ , (Me-Ala) ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , His ¹⁵ , Glu ¹⁷ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹ , Ada ³⁰]hGH-RH(1-30)OH
P-12868	[(Dca-Ada) ⁰ -Tyr ¹ , D-Arg ² , Fpa5 ⁶ , (Me-Ala) ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , His ¹⁵ , Glu ¹⁷ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹ , Ada ³⁰]hGH-RH(1-30)OH
P-12870	[PhF ₅ Ac ⁰ -Tyr ¹ , D-Arg ² , Fpa5 ⁶ , (Me-Ala) ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , His ¹⁵ , Glu ¹⁷ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹ , Ada ³⁰]hGH-RH(1-30)OH
P-12872	[PhAc ⁰ -Tyr ¹ , D-Arg ² , Fpa5 ⁶ , (Me-Ala) ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , His ¹⁵ , Glu ¹⁷ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹ , Ada ³⁰]hGH-RH(1-30)OH
P-12874	[Dca ⁰ -Tyr ¹ , D-Arg ² , Fpa5 ⁶ , (Me-Ala) ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , His ¹⁵ , Glu ¹⁷ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹ , Ada ³⁰]hGH-RH(1-30)OH
P-12880	[(PhAc-Ada) ⁰ -Fpa5 ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , His ¹⁵ , Glu ¹⁷ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹]hGH-RH(1-29)NH ₂
P-12890	[PhAc ⁰ -Fpa5 ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , His ¹⁵ , Glu ¹⁷ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹ , Ada ³⁰]hGH-RH(1-29)NH ₂
P-12900	[(PhAc-Ada) ⁰ -Fpa5 ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , His ¹⁵ , Glu ¹⁷ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹ , Agm ³⁰]hGH-RH(1-29)NH ₂
P-12920	[(PhAc-Ada) ⁰ -Fpa5 ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , Fpa5 ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , His ¹⁵ , Glu ¹⁷ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹ , Ada ³⁰]hGH-RH(1-29)OH

7. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso en el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.

5 8. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso en el tratamiento de:

a.) la supresión de niveles de GH en un paciente;

10 b.) la supresión de niveles de IGF-I o IGF-II en el tejido tumoral de un paciente que tiene un cáncer que porta receptores para IGF-I;

c.) la supresión de niveles de VEGF o FGF en el tejido tumoral de un paciente que tiene un cáncer;

15 d.) la supresión de IGF-I en un paciente;

e.) la supresión de niveles de IGF-I en suero en un paciente que tiene un cáncer que porta receptores para IGF-I;

20 f.) la supresión de niveles de GH en un paciente que tiene un cáncer que porta receptores para IGF-I o GH;

g.) para bloquear receptores para GH-RH en un paciente que tiene un cáncer que porta receptores para GH-RH; o

25 h.) disminuir la aparición de reestenosis de vasos sanguíneos en un paciente.

9. Composición que puede administrarse farmacológicamente para su uso en el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia, que comprende un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y un portador farmacológicamente aceptable.

30 10. Composición según la reivindicación 9, para su uso en el tratamiento de

a.) la supresión de niveles de GH en un paciente;

35 b.) la supresión de niveles de IGF-I o IGF-II en el tejido tumoral de un paciente que tiene un cáncer

que porta receptores para IGF-I;

c.) la supresión de niveles de VEGF o FGF en el tejido tumoral de un paciente que tiene un cáncer;

5 d.) la supresión de IGF-I en un paciente;

e.) la supresión de niveles de IGF-I en suero en un paciente que tiene un cáncer que porta receptores para IGF-I;

10 f.) la supresión de niveles de GH en un paciente que tiene un cáncer que porta receptores para IGF-I o GH;

g.) para bloquear receptores para GH-RH en un paciente que tiene un cáncer que porta receptores para GH-RH; o

15 h.) disminuir la aparición de reestenosis de vasos sanguíneos en un paciente.