



NORGE

(19) [NO]

[B] (12) **UTLEGNINGSSKRIFT** (11) **NR. 153809**

STYRET FOR DET
INDUSTRIELLE RETTSVERN

(51) Int. Cl.⁴ C 07 K 7/20

(21) Patentsøknad nr. 812814
(22) Inngivelsesdag 20.08.81
(24) Løpedag 20.08.81
(62) Avdelt/utskilt fra søknad nr.

(86) Internasjonal søknad nr. -
(86) Internasjonal inngivelsesdag -
(85) Videreføringsdag -
(41) Alment tilgjengelig fra 01.03.82
(44) Utlegningsdag 17.02.86

(71)(73) Søker/Patenthaver THE SALK INSTITUTE FOR BIOLOGICAL STUDIES,
10010 North Torrey Pines Road,
La Jolla, CA,
USA.
(72) Oppfinner WYLIE WALKER VALE, JR.,
La Jolla, CA,
JEAN EDOUARD FREDERIC RIVIER,
La Jolla, CA,
USA.

(74) Fullmektig Siv.ing. Audun Kristensen,
J.K. Thorsens Patentbureau A/S, Oslo.

(30) Prioritet begjært 29.08.80, USA, nr 182594.

(54) Oppfinnelsens benevnelse ANALOGIFREMGANGSMÅTE FOR FREMSTILLING AV
TERAPEUTISK AKTIVE POLYPEPTIDER.

(57) Sammendrag

Peptider som inhiberer sekresjonen av gonadotropiner i hypofysen og inhiberer frigivelse av steroider av gonadene. Tilførsel av en effektiv mengde av peptidene forhindrer ovulasjon av hunn-pattedyregg og/eller frigivelse av steroider i gonadene. Peptidene har strukturen:

R_1 -dehydro Pro- R_2 -D-Trp-Ser-Tyr-D-Trp-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂
hvor R_1 er valgt fra gruppen bestående av hydrogen, formyl, acetyl, acrylyl, benzoyl og allyl, R_2 er valgt fra gruppen bestående av

diklor-D-Phe, CaMe₄Cl-D-Phe, (CH₃)₅-D-Phe, CF₃-D-Phe, F-D-Phe, difluoro-D-Phe, AcNH-D-Phe, NO₂-D-Phe, dinitro-D-Phe, Br-D-Phe, dibrom-D-Phe, CH₃S-D-Phe, OCH₃-D-Phe og CH₃-D-Phe
hvor i hvilken som helst D-isomer aminosyre kan erstatte D-Trp i 6-stillingen og hvor i NaMeLeu kan erstatte Leu.

(56) Anførte publikasjoner Ingen.

Foreliggende oppfinnelse vedrører en analogifremgangsmåte for fremstilling av terapeutisk aktive polypeptider med generell formel:

R_1 -dehydro Pro- R_2 -D-Trp-Ser-Tyr-D-Trp-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂,
hvor R_1 er hydrogen, formyl, acetyl, acrylyl, benzoyl eller allyl, R_2 er diklor-D-Phe, CF₃-D-Phe, F-D-Phe, difluor-D-Phe, AcNH-D-Phe, NO₂-D-Phe, dinitro-D-Phe, Br-D-Phe, dibrom-D-Phe, C^αMe₄Cl-D-Phe, (CH₃)₅-D-Phe, CH₃S-D-Phe, OCH₃-D-Phe eller CH₃-D-Phe, idet hvilken som helst D-isomer-aminosyre kan erstatte D-Trp i 6-stillingen, og hvori N^αMeLeu kan erstatte Leu.

Det karakteristiske ved oppfinnelsen er at

a) det dannes en mellomproduktforbindelse med formel:

X^1 -dehydro Pro- R_2 -D-Trp-Ser(X^2)-Tyr-(X^3)-D-Trp-Leu-Arg(X^4)-Pro-Gly- X^5 hvori X^1 er en α -aminobeskyttende gruppe, og tilsvarende R_1 , når den sistnevnte er acetyl, formyl, acrylyl, benzoyl eller allyl, X^2 er en beskyttende gruppe for den alkoholiske hydroksylgruppe i Ser, X^3 er en beskyttende gruppe for den fenoliske hydroksylgruppe i Tyr, X^4 er en beskyttende gruppe for nitrogenatomene i Arg, og X^5 er O-CH₂-(harpiksbærer), NH-(harpiksbærer) eller NH₂, hvori minst en av de ovennevnte beskyttende grupper og/eller harpikser er tilstede, hvorefter

b) ovennevnte beskyttende gruppe(r) og/eller harpiksbærer avspaltes og om ønsket omdannes det resulterende peptid til et ikke giftig salt derav.

Hypofysen er festet ved hjelp av en stilk til det område i bunnen av hjernen som er kjent som hypothalamus. Hypofysen har to lapper, nemlig forlappen og baklappen. Baklappen i hypofysen lagrer og fører to hormoner fremstilt i hypothalamus, nemlig vasopressin og oksytocin, ut i det generelle kretsløp. Forlappen i hypofysen utskiller et antall hormoner som er komplekse protein- eller glyko-protein-molekyler som føres gjennom blodstrømmen til forskjellige organer og som i sin tur stimulerer utskillelsen i blodstrømmen av andre hormoner fra de perifere organer. Spesielt frigis fra hypofysen

153809

2

follikkel-stimulerende hormon (FSH) og luteiniserende hormon (LH) enkelte ganger nevnt som gonadotropiner eller gonadotrope hormoner. Disse hormoner regulerer i kombinasjon funksjonen av gonadene for fremstilling av testosteron i testiklene og progesteron og østrogen i ovariene, og regulerer også fremstilling og metning av gametene.

Frigivelsen av et hormon fra forlappen i hypofysen krever vanligvis en tidligere frigivelse av en annen klasse av hormoner fremstilt av hypothalamus. Et av hypothalamus-hormonene virker som en faktor som igangsetter frigivelse av de gonadotrope hormoner, spesielt LH. Hypothalamus-hormonet som virker som en frigivende faktor for LH betegnes heri som LRF selv om det også er blitt omtalt som LH-RH og som GnRH. LRF er blitt isolert og karakterisert som et deka-peptid med følgende struktur:

p-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂

Peptider er forbindelser som inneholder to eller flere aminosyrer hvori karboksylgruppen i en syre er knyttet til aminogruppen i den annen syre. Formelen for LRF, som gjengitt ovenfor, er i samsvar med den konvensjonelle representering av peptider hvor aminogruppen forekommer til venstre og karboksylgruppen til høyre. Posisjonen av aminosyreresten er identifisert ved nummerering av aminosyrerestene fra venstre mot høyre. I tilfellet med LRF er hydroksyldelen av karboksylgruppen i glycine erstattet med en aminogruppe NH₂. Forkortelsene for de individuelle aminosyrerester ovenfor er konvensjonelle og er basert på trivialnavnene av aminosyrene, hvor p-Glu er pyroglutaminsyre, His er histidin, Trp er tryptofan, Ser er serin, Tyr er tyrosin, Gly er glycine, Leu er leucin, Arg er arginin og Pro er prolin. Med unntagelse av glycine er aminosyrene i de ved oppfinnelsen fremstillbare peptider av L-konfigurasjon med mindre annet er angitt. Acetyl forkortes som Ac og acrylyl forkortes som Acr.

Det er kjent at erstatning av Gly i 6-stillingen av LRF-deka-peptid med D-aminosyrer tilveiebringer et peptidmaterial med

fra omtrent 1 til 35 ganger større virkning enn LRF for å bevirke frigivelse av LH og andre gonadotropiner fra hypofysen i pattedyr, og den frigivende effekt oppnås når LRF-analogen innføres i blodstrømmen av et pattedyr.

Det er også kjent at erstatning av His (eller utelatelse av His) i 2-stillingen av LRF-dekapeptidet med forskjellige aminosyrer frembringer analoger med en inhiberende virkning på frigivelsen av LH og andre gonadotropiner fra hypofysen i pattedyr. Spesielt oppnås forskjellige grader av inhibering av frigivelsen av LH når His utelates (des-His) eller erstattes med D-Ala, D-Phe eller Gly. Den inhiberende effekt av slike peptider modifisert ved 2-stillingen kan ytterligere økes når en D-aminosyre erstatter Gly i 6-stillingen av deka-peptidene. F.eks. er peptidet: p-Glu-Trp-Ser-Tyr-D-Ala-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ fire ganger mer effektiv som inhibitor for frigivelse av gonadotropiner enn det samme peptid hvori Gly er tilstede i 6-stillingen og ikke D-Ala.

Noen hunn-pattedyr som ikke har noen ovulasjonssyklus og som ikke viser noen hypofyse- eller ovarie-defekt begynner å utskille normale mengder av gonadotropinene LH og FSH etter den passende tilførsel av LRF. Tilførselen av LRF er således betraktet som egnet for behandling av de tilfeller hvori ufruktbarhet forårsakes av en funksjonell mangel i hypothalamus.

Der er også grunner for ønsket om å forhindre ovulering i hunn-pattedyr og tilførsel av LRF-analoger som er antagonistiske mot den normale funksjon av LRF har vært anvendt for å forhindre ovulering. Av denne grunn har analoger av LRF som er antagonistiske overfor LRF vært undersøkt for deres mulige bruk som et prevensjonsmiddel eller for å regulere besvangringsperioder. Det er ønskelig å tilveiebringe peptider som er sterkt antagonistiske overfor endogent LRF og som forhindrer sekresjon av LH og frigivelse av steroider i gonadene i pattedyr.

Den foreliggende oppfinnelse tilveiebringer peptider som inhi-

berer frigivelsen av gonadotropiner i pattedyr, inklusive mennesker, og muliggjør inhibering av frigivelse av steroider i gonadene i hann- og hunn-pattedyr. De forbedrede LRF-analoger er antagonistiske overfor LRF og har en inhiberende virkning på reproduksjonsprosessene i pattedyr. Disse analoger kan anvendes for å forhindre fremstilling av gonadotropiner og kjønns hormoner under forskjellige forhold inkludert for tidlig pubertet, hormonavhengig neoplasia, dysmenorrea og endometreosis.

De ved fremgangsmåten i henhold til oppfinnelsen fremstillbare peptider inhiberer sterkt sekresjonen av gonadotropiner fra hypofysen i pattedyr, inklusive mennesker og/eller inhiberer frigivelsen av steroider i gonadene. Disse peptider er analoger av LRF hvori det er foretatt substitusjoner i 1- og 2-stillingene, og D-Trp kan være tilstede i 3- og 6-stillingene. Andre D-isomer aminosyrer kan anvendes i 6-stillingen, men det anvendes foretrukket en aromatisk D-isomer aminosyre som f.eks. D-Trp eller (imBzl) D-His. 1-stillingen inneholder dehydro-Pro eller en modifikasjon derav hvori dens alfa-aminogruppe inneholder formyl, acetyl, acrylyl, benzoyl eller allyl. Med dehydro-Pro menes 3,4 dehydroprolin, $C_5H_7O_2N$, og når R_1 er acyl eller alkyl-radikal er denne knyttet til nitrogenet. Modifisert D-Phe er tilstede i 2-stillingen og tilveiebringer økt antagonistisk aktivitet som en følge av de spesifikke modifikasjoner som er tilstede i benzenringen. Enkle substitusjoner er foretatt for hydrogen foretrukket i 4-stillingen og doble substitusjoner gjøres foretrukket i 2,4 eller 3,4 posisjonene. Substitusjonene velges fra diklor, metyl, fluor, difluor, trifluormetyl, metoksy, brom, dibrom, nitro, dinitro, acetylamino, pentametyl og metyl-mercapto. I tillegg kan metyl-substitusjon på alfa-karbonatomet pluss para-klor substitusjon anvendes.

På grunn av at disse peptider er meget effektive for å hindre frigivelse av LH benevnes de ofte som LRF-antagonister. Peptidene inhiberer ovulering i hunn-pattedyr når de tilføres i meget små mengder ved pro-østerøs tidspunkt og er også effek-

tive til å bevirke resorpsjon av befruktede egg hvis tilført kort etter befruktningen.

De ved fremgangsmåten i henhold til oppfinnelsen fremstillbare peptider kan syntetiseres ved hjelp av en fastfaseteknikk under anvendelse av klormetylert harpiks, en metyl-benzhydrylaminharpiks (MBHA) eller en benzhydrylamin (BHA). Syntesen gjennomføres ved trinnvis addisjon av aminosyrene i kjeden på den måte som er angitt detaljert i US patentskrift 4.211.693. Sidekjedebeskyttende grupper, som vel kjent innen den gren av teknikken, tilsettes til Ser, Tyr, Arg og His før disse aminosyrer kobles til kjeden som bygges opp på harpiksen.

En slik metode tilveiebringer det fullt beskyttede mellomprodukt-peptidoresin. Det fullt beskyttede peptid kan avspaltes fra den klormetylerte harpiksbærer ved ammonolyse som vel kjent innen denne teknik, til å gi det fullt beskyttede amidmellomprodukt. Mellomproduktene kan representeres som:

X^1 -dehydro Pro- R_2 -D-Trp.Ser(X^2)-Tyr(X^3)-D-Trp-Leu Arg(X^4)-Pro-Gly- X^5 hvori X^1 er en α -aminobeskyttende gruppe av den type som er kjent å være nyttig ved den trinnvise syntese av polypeptider og når R_1 i den ønskede peptidsammensetning er en spesiell acyl- eller alkyl-gruppe kan denne gruppe anvendes som beskyttende gruppe. Blant de klasser av α -aminobeskyttende grupper som dekkes av X^1 er (1) acyl-type beskyttende grupper som formyl, trifluoracetyl, ftalyl, Tos, benzoyl, benzensulfonyl, nitrofenylsulfenyl, tritylsulfenyl, o-nitrofenoksyacetyl, acrylyl, kloracetyl, acetyl og γ -klorbutyryl, (2) aromatiske uretantype-beskyttende grupper som f.eks. benzyloksykarbonyl og substituert benzyloksykarbonyl som f.eks. p-klor-benzyloksykarbonyl, p-nitrobenzyloksykarbonyl, p-brombenzyloksykarbonyl og p-metoksybenzyloksykarbonyl, (3) alifatiske uretanbeskyttende grupper som f.eks. terbutyloksykarbonyl (Boc), diisopropylmetoksykarbonyl, isopropylloksykarbonyl, etoksykarbonyl og allyloksykarbonyl, (4) cykloalkyl uretantype-beskyttende grupper som f.eks. cyklo-

pentyloksykarbonyl, adamantyloksykarbonyl og cykloheksyloksykarbonyl, (5) thiouretantype-beskyttende grupper som f.eks. fenylthiokarbonyl, (6) alkyltype-beskyttende grupper som f.eks. allyl, trifenylmetyl(trityl) og benzyl, (7) trialalkylsilangrupper som f.eks. trimetylsilan. Den foretrukne α -aminobeskyttende gruppe er Boc når R_1 er hydrogen.

X^2 er en beskyttende gruppe for den alkoholiske hydroksylgruppe i Ser og velges fra gruppen bestående av acetyl, benzoyl, tetrahydropyranyl, tert-butyl, trityl, benzyl og 2,6-diklorbenzyl. Benzyl foretrekkes.

X^3 er en beskyttende gruppe for den fenoliske hydroksylgruppe i Tyr og velges fra gruppen bestående av tetrahydropyranyl, tert-butyl, trityl, benzyl, benzyloksykarbonyl, 4-brombenzyloksykarbonyl og 2,6-diklorbenzyl.

X^4 er en beskyttende gruppe for nitrogenatomer i Arg og velges fra gruppen bestående av nitro, Tos, benzyloksykarbonyl, adamantyloksykarbonyl og Boc. Alternativt kan X^4 være hydrogen som betyr at der ikke er noen beskyttende grupper på sidekjede-nitrogenatomene i arginin.

X^5 er NH_2 eller $-O-CH_2-$ (harpiksbærer) eller $-NH-$ (harpiksbærer).

Kriteriet for utvelgelse av sidekjede-beskyttende grupper for X^2 - X^4 er at den beskyttende gruppe må være stabil overfor reagenset under reaksjonsbetingelsene valgt for å fjerne den α -aminobeskyttende gruppe ved hvert trinn av syntesen. Den beskyttende gruppe må ikke avspaltes under koblingsreaksjoner, og den beskyttende gruppe må kunne fjernes etter fullført syntese av den ønskede aminosyresekvens under reaksjonsbetingelser som ikke vil endre peptidkjeden.

Når X^5 -gruppen er $-O-CH_2-$ (harpiksbærer) representeres esterandelen av en av de mange funksjonelle grupper av polystyren-

harpiksbæreren. Når X^5 -gruppen er $-NH$ (harpiksbærer) forbindes en amidbinding Bly til BHA-harpiks eller til en metyl-BHA-harpiks.

Når R_1 er acetyl, formyl, acrylyl, benzoyl eller allyl kan den anvendes som beskyttende grupper X^1 for α -aminogruppen i prolin og i dette tilfelle kan den tilsettes til prolin før den kobles til peptidkjeden. Alternativt kan en reaksjon gjennomføres med peptidet på harpiksen, f.eks. reaksjon med eddiksyre i nærvær av dicykloheksyl karbodiimid (DCC) eller med eddiksyre anhydrid.

Avspaltning av beskyttende grupper så vel som spaltning av peptidet fra benzhydrylamin-harpiksen foregår ved $0^\circ C$ med flusssyre (HF). Anisol tilsettes til peptidet før behandlingen med HF. Etter fjernelsen av HF under vakuum behandles det avspaltede, avbeskyttede peptid med eter, dekanteres, opptas i fortynnet eddiksyre og frysetørkes.

Rensing av peptidet kan gjennomføres ved hjelp av ionebytterkromatografi på en CMC-kolonne, etterfulgt av fordelingskromatografi under anvendelse av elueringsssystemet n -butanol, 0,1N eddiksyre (1:1 volumforhold) på en kolonne fylt med "Sephadex" G 25. De ved fremgangsmåten i henhold til oppfinnelsen fremstillbare peptider er effektive i mengder på mindre enn 200 mikrogram pr. kilogram kroppsvekt ved tilførsel midt på dagen ved pro-østrodagen, for å forhindre ovulasjon i hunnrotter. For forlenget undertrykkelse av ovulasjonen kan det være nødvendig å anvende doseringsnivåer i området fra omtrent 0,1 til omtrent 5 milligram pr. kilogram kroppsvekt.

Da disse forbindelser vil redusere testosteronnivåene (en uønsket følge i den normale, seksuelt aktive hann) kan det være fornuftig å tilføre erstatningsdoser av testosteron sam-

men med LRF-antagonisten.

De følgende eksempler illustrerer forskjellige trekk ved forbindelsene fremstilt ifølge oppfinnelsen.

EKSEMPEL

De følgende peptider med formel R_1 -dehydro Pro- R_2 -D-Trp-Ser-Tyr-D-Trp-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ fremstilles ved hjelp av den tidligere nevnte fastfase-metode.

TABELL 1

PEPTID	R_1	R_2
1	Ac	3,4 Cl ₂ -D-Phe
2	"	4 CF ₃ -D-Phe
3	"	4 F-D-Phe
4	"	4 AcNH-D-Phe
5	"	4 NO ₂ -D-Phe
6	"	4 Br-D-Phe
7	"	4 CH ₃ S-D-Phe
8	"	4 OCH ₃ -D-Phe
9	"	4 CH ₃ -D-Phe
10	"	2,4 Cl ₂ -D-Phe
11	Ac	3,4 Cl ₂ -D-Phe
12	Ac	4 OCH ₃ -D-Phe(N ^α MeLeu ⁷)
13	"	4 CH ₃ -D-Phe(N ^α MeLeu ⁷)
14	"	3,4, Cl ₂ -D-Phe(N ^α MeLeu ⁷)
15	"	(CH ₃) ₅ -D-Phe
16	"	C ^α Me ₄ Cl-D-Phe
17	"	3 F-D-Phe

Som et eksempel er en representativ fastfase- synteseav peptid nr. 1 ovenfor, benevnt Ac-dehydro Pro¹, 3,4 Cl₂-D-Phe², D-Trp^{3,6}-LRF angitt i det følgende. Dette peptid har formelen Ac-dehydro Pro-3,4 Cl₂-D-Phe-D-Trp-Ser-Tyr-D-Trp-Leu-Arg-Pro-

Gly-NH₂.

Det anvendes en BHA-harpiks og Boc-beskyttet bly kobles til harpiksen i løpet av en 2 timers periode i CH₂Cl₂ under anvendelse av et tredobbelt overskudd av Boc-derivat og DCC som et aktiveringsmiddel. Glycin-resten knyttes til BHA-resten ved hjelp av en amidbinding.

Etter denne kobling av hver aminosyrerest gjennomføres vasking, avblokkering og kobling av den neste aminosyrerest i samsvar med den følgende plan under anvendelse av en automatisert maskin og hvor man begynner med omtrent 5 g harpiks:

TRINN	REAGENSER OG OPERASJONER	BLANDETID MINUTTER
1	CH ₂ Cl ₂ vasking-80 ml (2 ganger)	3
2	Metanol (MeOH) vasking-30 ml (2 ganger)	3
3	CH ₂ Cl ₂ vasking-80 ml (3 ganger)	3
4	50% TFA pluss 5% 1,2 etandithiol i CH ₂ Cl ₂ -70 ml (2 ganger)	10
5	CH ₂ Cl ₂ vasking-80 ml (3 ganger)	3
6	TEA 12,5% i CH ₂ Cl ₂ -70 ml (2 ganger)	5
7	MeOH vasking-40 ml (2 ganger)	2
8	CH ₂ Cl ₂ vasking-80 ml (3 ganger)	3
9	Boc-aminosyre (10 mmol) i 30 ml enten DMF eller CH ₂ Cl ₂ avhengig av oppløseligheten av den spesielle beskyttede aminosyre (1 gang) pluss DCC (10 mmol) i CH ₂ Cl ₂	30-300
10	MeOH vasking-40 ml (2 ganger)	3
11	TEA 12,5% i CH ₂ Cl ₂ -70 ml (1 gang)	3
12	MeOH vasking-30 ml (2 ganger)	3
13	CH ₂ Cl ₂ vasking-80 ml (2 ganger)	3

Etter trinn 13 tas en prøve for en ninhydrintest og hvis denne test er negativ går man tilbake til trinn 1 for kobling av den neste aminosyre og hvis testen er positiv eller svakt positiv går man tilbake og gjentar trinnene 9 - 13.

Den ovennevnte plan anvendes for kobling av hver av aminosyrene i peptidet fremstilt i henhold til oppfinnelsen etter at den første aminosyre er blitt tilknyttet. N α -Boc-beskyttelse anvendes for hver av de resterende aminosyrer under hele syntesen. Sidekjeden av Arg beskyttes med Tos. OBzl anvendes som en sidekjede beskyttende gruppe for hydroksylgruppen i Ser, og 2,6-diklorbenzyl anvendes som den sidekjede beskyttende gruppe for hydroksylgruppen i Tyr. N-acetyl-dehydro-Pro innføres som den endelige aminosyre. Boc-Arg(Tos) og Boc-D-Trp som har lav oppløselighet i CH₂Cl₂ kobles under anvendelse av DMF.

Avspaltningen av peptidet fra harpiksen og fullstendig avbeskyttelse av sidekjedene foregår meget lett ved 0°C med HF. Anisol tilsettes som et spylemiddel før HF-behandlingen. Etter fjernelsen av HF under vakuum ekstraheres harpiksen ved 50% eddiksyre og vaskeblandingen frysetørkes til å gi et urent peptidpulver.

Rensning av peptidet gjennomføres ved ionebytterkromatografi på CMC (Whatman CM 32, under anvendelse av en gradient på 0,05 til 0,3M NH₄OAc i 50/50 metanol/vann) etterfulgt av fordelingskromatografi i en gelfiltreringskolonne under anvendelse av elueringssystemet n-Butanol; 0,1N eddiksyre (1:1 -volumforhold).

Peptidet som er angitt i den tidligere anførte tabell prøves in vitro og in vivo. In vitro-testen foretas under anvendelse av dissosierte rotte-hypofyseceller opprettholdt i kultur i 4 døgn før forsøket. Nivåene for LH formidlet i avhengighet av tilførselen av peptidene bedømmes ved hjelp av spesifikk radio-immuno bedømmelse for rotte-LH.

Kontrollskåler av celler mottar bare en utmålt mengde som er 3 nanomolar med hensyn til LRF og forsøksskålene mottar en utmålt mengde som er 3 nanomolar med hensyn til LRF pluss en konsentrasjon av testpeptid fra 0,01 til 3 nanomolar. Mengden av LH sekretet i prøvene som bare behandles med LRF

sammenlignes med mengden sekretet i prøvene som behandles med peptidet pluss LRF. Resultatene beregnes og uttrykkes i tabell II (kolonnen for in vitro) som molart konsentrasjonsforhold mellom testpeptid og LRF (antagonist/LRF) nødvendig for å redusere mengden av LH frigitt av 3 nanomolar LRF til 50% av kontrollverdien (ICR50).

De ovenfor beskrevne peptider ble anvendt for å bestemme effektiviteten ved forhindring av ovulasjonen i hunnrotter. I denne test blir et spesifikt antall voksne hunnrotter Sprague-Dawley hver med en kroppsvekt fra 225 til 250 gram injisert ved enten 5 eller 10 mikrogram peptid i maisolje omtrent midt på dagen på proestro-dagen. Proestrotidspunktet er om ettermiddagen før østro (ovulasjon). En separat gruppe av hunnrotter anvendes som en kontroll og disse tilføres ikke peptidet. Hver av kontroll-hunnrottene har ovulasjon ved østro. Som angitt i kolonnen for in vivo er peptidene bemerkelsesverdige effektive til å forhindre ovulasjon av hunnrotter i en meget lav dosering, og alle peptidblandingene antas å være fullstendig effektive ved en dose på 1 milligram.

TABELL II

Peptid	<u>In Vitro</u>	<u>In Vivo (10,ug)</u>	<u>In Vivo (5,ug)</u>
	ICR ₅₀	Rotter Ovulerende	Rotter Ovulerende
1	0.039		1/10
2	0.070		7/9
3	0.021		0/10
4	0.500	9/10	
5	0.011		2/10
6	0.010		5/7
7	0.030		7/10
8	0.125	3/10	
9	0.044	1/7	
10	0.034		4/7

TABELL II (forts.)

11	0.048	
12	0.29	5/10
13	0.11	3/4
14	0.05	1/3
15	0.375	7/10
16	0.045	2/10
17		5/7

Disse peptider kan tilføres pattedyr intravenøst, subkutan, intramuskulært eller oralt for å oppnå frukbarhetsinhibering og/eller kontroll. Effektive doseringer vil variere ved tilførselformen og de spesielle arter av pattedyr som behandles. Et eksempel på en typisk doseringsform er en fysiologisk saltoppløsning inneholdende peptidet idet denne oppløsning tilføres til å gi en dose i området 0.1 til 5 mg/kg kroppsvekt. Oral tilførsel av peptidet kan gis i enten fast eller flytende form.

PATENTKRAV

Analogifremgangsmåte for fremstilling av terapeutisk aktive polypeptider med generell formel:

R_1 -dehydro Pro- R_2 -D-Trp-Ser-Tyr-D-Trp-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂,
hvor R_1 er hydrogen, formyl, acetyl, acrylyl, benzoyl eller allyl, R_2 er diklor-D-Phe, CF₃-D-Phe, F-D-Phe, difluor-D-Phe, AcNH-D-Phe, NO₂-D-Phe, dinitro-D-Phe, Br-D-Phe, dibrom-D-Phe, C^αMe₄Cl-D-Phe, (CH₃)₅-D-Phe, CH₃S-D-Phe, OCH₃-D-Phe eller CH₃-D-Phe, idet hvilken som helst D-isomer-aminosyre kan erstatte D-Trp i 6-stillingen, og hvor N^αMeLeu kan erstatte Leu,

k a r a k t e r i s e r t v e d

a) det dannes en mellomproduktforbindelse med formel:

X^1 -dehydro Pro- R_2 -D-Trp-Ser(X^2)-Tyr-(X^3)-D-Trp-Leu-Arg(X^4)-Pro-Gly- X^5 hvor X^1 er en α -aminobeskyttende gruppe og tilsvarende R_1 , når den sistnevnte er acetyl, formyl, acrylyl, benzoyl eller allyl, X^2 er en beskyttende gruppe for den alkoholiske hydroksylgruppe i Ser, X^3 er en beskyttende gruppe for den fenoliske hydroksylgruppe i Tyr, X^4 er en beskyttende gruppe for nitrogenatomene i Arg, og X^5 er O-CH₂-(harpiksbærer), NH-(harpiksbærer) eller NH₂, hvor minst en av de ovennevnte beskyttende grupper og/eller harpiksbærer er tilstede, hvorefter

b) ovennevnte beskyttende gruppe(r) og/eller harpiksbærer avspaltes og om ønsket omdannes det resulterende peptid til et ikke giftig salt derav.