



(12) Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **235 874 A5**4(51) C 07 K 7/20
C 07 K 1/04

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	AP C 07 K / 269 937 0	(22)	27.11.84	(44)	21.05.86
(31)	556,148	(32)	29.11.83	(33)	US

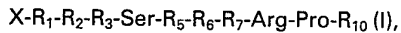
(71) siehe (73)
 (72) Roeske, Roger W., US
 (73) The Salk Institute for Biological Studies, La Jolla, California 92037, US

(54) Verfahren zur Herstellung eines Peptides

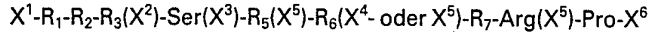
(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Peptids für die Anwendung als Arzneimittel, insbesondere zur Verhinderung der Ovulation von Eizellen weiblicher Säuger und/oder der Freisetzung von Steroiden durch die Gonaden. Ziel der Erfindung ist die Bereitstellung neuer Peptide, die gegenüber endogenem GnFH stark antagonistisch wirken und die die Sekretion von LH sowie die Freisetzung von Steroiden durch die Gonaden von Säugern verhindern. Erfindungsgemäß werden Peptide der folgenden Struktur hergestellt
 $X-R_1-R_2-R_3-Ser-R_5-R_6-R_7-Arg-Pro-R_{10}$, wobei X für Wasserstoff, Acr oder Ac steht; R_1 ist β -D-2NAL, dehydroPro oder 4Cl-D-Phe; R_2 ist Cl-D-Phe, F-D-Phe oder $C^{\alpha}Me-Cl-D-Phe$; R_3 ist D-Trp oder β -D-2NAL; R_5 ist Arg oder D-Arg; R_6 ist D-Tyr, β -D-2NAL oder D-Arg; R_7 ist Leu oder NML; und R_{10} ist Gly-NH₂, NHCH₂CH₃ oder D-Ala-NH₂.

Erfindungsanspruch:

1. Verfahren zur Herstellung eines Peptids der allgemeinen Formel I:



wobei X Wasserstoff, Acr oder Ac darstellt; R₁ β-D-2NAL, DehydroPro oder 4Cl-D-Phe ist; R₂ Cl-D-Phe, F-D-Phe oder C-α-Me-Cl-D-Phe darstellt; R₃ D-Trp oder β-D-2NAL ist; R₅ Arg oder D-Arg darstellt; R₆ D-Tyr, β-D-2NAL oder D-Arg ist; R₇ Leu oder NML darstellt und R₁₀ Gly-NH₂, NHCH₂CH₃ oder D-Ala-NH₂ darstellt, oder eines seiner nichttoxischen Salze, **gekennzeichnet dadurch**, daß (a) eine Zwischenverbindung mit der Formel



gebildet wird, wobei X¹ Wasserstoff oder eine α-Aminoschutzgruppe darstellt; X² Wasserstoff oder eine Schutzgruppe für den Indolstickstoff von Trp ist; X³ Wasserstoff oder eine Schutzgruppe für die alkoholische Hydroxylgruppe von Ser darstellt; X⁴ Wasserstoff oder eine Schutzgruppe für die phenolische Hydroxylgruppe von Tyr ist; X⁵ Wasserstoff oder eine Schutzgruppe für die Stickstoffatome von Arg darstellt und X⁶ aus der Gruppe selektiert wird, die aus Gly-O-CH₂- (Harzträgersubstanz), O-CH₂- (Harzträgersubstanz), D-Ala-O-CH₂- (Harzträgersubstanz), Gly-NH- (Harzträgersubstanz), D-Ala-NH- (Harzträgersubstanz) besteht, indem an eine unlösliche Harzträgersubstanz die in Formel I dargestellten Aminosäuren entweder einzeln oder in Gruppen in der Reihenfolge R₁₀, Pro, Arg, R₇, R₆, R₅, Ser, R₃, R₂ und R₁ gekoppelt werden, wobei jede dieser Säuren oder Gruppen ihre freie α-Aminogruppe besitzt, geschützt durch X¹, wobei dieser Schutz später vor der nächsten Kopplungsstufe aufgehoben wird; daß (b) eine oder mehrere der Gruppen X¹ bis X⁵ abgespalten werden und sich von der Harzträgersubstanz abspalten und wenn gewünscht, ein sich bildendes Peptid in eines seiner nichttoxischen Salze umgewandelt wird.

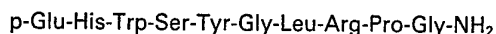
2. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß R₅ für Arg steht und R₇ für Leu steht.
3. Verfahren nach Punkt 1 oder 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß X für Ac steht, R₁ ist β-D-2NAL und R₃ ist D-Trp.
4. Verfahren nach irgendeinem der Punkte 1, 2 und 3, **gekennzeichnet dadurch**, daß R₂ für C^αMe-4-Cl-D-Phe steht.
5. Verfahren nach Punkt 4, **gekennzeichnet dadurch**, daß R₆ für D-Arg steht.
6. Verfahren nach Punkt 4, **gekennzeichnet dadurch**, daß R₆ für D-Tyr steht.
7. Verfahren nach irgendeinem der Punkte 1, 2 und 3, **gekennzeichnet dadurch**, daß R₆ für β-D-2NAL steht.
8. Verfahren nach irgendeinem der Punkte 1, 2 und 3, **gekennzeichnet dadurch**, daß R₂ für 4Cl-D-Phe steht.
9. Verfahren nach irgendeinem der Punkte 1 bis 8, **gekennzeichnet dadurch**, daß R₁₀ für D-Ala-NH₂ steht.
10. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß das Peptid eine spezifische Zusammensetzung aufweist derart, daß R₁ für β-D-2NAL, R₂ für C^αMe-4Cl-D-Phe, R₃ für D-Trp, R₆ für D-Arg und R₁₀ für D-Ala-NH₂ steht.
11. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß das Peptid eine spezifische Zusammensetzung aufweist derart, daß R₁ für β-D-2NAL, R₂ für C^αMe4Cl-D-Phe, R₃ für D-Trp, R₆ für D-Tyr und R₁₀ für D-Ala-NH₂ steht.
12. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß das Peptid eine spezifische Zusammensetzung aufweist derart, daß R₁ für β-D-2NAL, R₂ für C^αMe4Cl-D-Phe, R₃ für D-Trp, R₆ für β-D-2NAL und R₁₀ für D-Ala-NH₂ steht.
13. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß das Peptid eine spezifische Zusammensetzung aufweist derart, daß R₁ für dehydroPro, R₂ für 4-F-D-Phe, R₃ für β-D-2NAL, R₆ für β-D-2NAL und R₁₀ für Gly-NH₂ steht.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Peptiden, welche die Freisetzung von Gonadotropinen durch die Hypophyse bei Säugern einschließlich des Menschen hemmen, sowie auf Methoden der Ovulationsverhinderung und/oder der Hemmung der Freisetzung von Steroiden. Speziell richtet sich die vorliegende Erfindung auf Peptide, welche die Gonadenfunktion inhibieren und die Freisetzung der Steroidhormone Progesteron und Testosteron hemmen.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Eines der hypothalamischen Hormone wirkt als ein die Freisetzung der gonadotropen Hormone — insbesondere LH — auslösender Faktor, und dieses Hormon wird hier als GnFH bezeichnet, obwohl es auch schon als LH-FH und als LFF bezeichnet worden ist. GnFH ist isoliert und als Decapeptid mit folgender Struktur charakterisiert worden:



Peptide sind zwei oder mehr Aminosäuren enthaltende Verbindungen, bei denen die Carboxyl-Gruppe einer Säure an die Amino-Gruppe der anderen Säure geknüpft ist. Die Formel für GnFH, wie sie oben dargestellt ist, entspricht der konventionellen Darstellung von Peptiden, bei der die Amino-Gruppe links und die Carboxyl-Gruppe rechts erscheint. Die Position des Aminosäurerestes wird durch Auszählen der Aminosäurereste von links nach rechts identifiziert. Im Falle von GnFH ist der Hydroxyl-Anteil der Carboxyl-Gruppe von Glycin durch eine Amino-Gruppe (NH₂) ersetzt worden. Die Abkürzungen für die einzelnen Aminosäurereste in der obigen Darstellung entsprechen dem herkömmlichen Gebrauch und basieren auf dem Trivialnamen der Aminosäure, z. B. steht p-Glu für Pyroglutaminsäure, His ist Histidin, Trp ist Tryptophan, Ser ist Serin, Tyr ist Tyrosin, Gly ist Glycin, Leu ist Leucin, Arg ist Arginin, Pro ist Prolin, Phe ist Phenylalanin, und Ala ist Alanin. Diese Aminosäuren werden gemeinsam mit Valin, Isoleucin, Threonin, Lysin, Asparaginsäure, Glutamin, Cystein, Methionin, Phenylalanin und Prolin generell als die üblichen, natürlich vorkommenden oder protein-abgeleiteten Aminosäuren angesehen. Mit Ausnahme von Glycin weisen die Aminosäuren der erfindungsgemäßen Peptide die L-Konfiguration auf, sofern dies nicht anderweitig vermerkt wird.

Es gibt Gründe dafür, die Ovulationshemmung beim weiblichen Säuger als wünschenswert erscheinen zu lassen, weshalb die Verabreichung von GnFH-Analoga, die sich zur normalen Funktion von GnFH antagonistisch verhalten, zur Ovulationsverhinderung angewendet worden ist. Aus diesem Grunde werden gegenüber GnFH antagonistische GnFH-Analoga hinsichtlich ihrer potentiellen Verwendungsmöglichkeit als Kontrazeptivum oder zur Regulierung von Empfängnisperioden untersucht. Derartige Antagonisten haben sich auch als brauchbar erwiesen, die Sekretion von Gonadotropinen bei männlichen Säugern zu regulieren und können als männliche Kontrazeptiva verwendet werden.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist die Bereitstellung neuer Peptide, die gegenüber endogenem GnFH stark antagonistisch wirken und welche die Sekretion von LH sowie die Freisetzung von Steroiden durch die Gonaden von Säugern verhindern.

Darlegung des Wesens der Erfindung

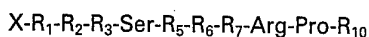
Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, neue Peptide mit den gewünschten Eigenschaften und Verfahren zu ihrer Herstellung aufzufinden.

Die vorliegende Erfindung stellt Peptide zur Verfügung, welche die Freisetzung von Gonadotropinen bei Säugern einschließlich des Menschen hemmen, gleichzeitig vermittelt sie Methoden zur Hemmung der Freisetzung von Steroiden durch die Gonaden von männlichen und weiblichen Säugern. Die verbesserten GnFH-Analoga wirken gegenüber GnFH antagonistisch und üben eine inhibitorische Wirkung auf die Reproduktionsprozesse bei Säugern aus. Diese Analoga können dafür verwendet werden, die Produktion von Gonadotropinen und Sexualhormonen unter verschiedenen Umständen einschließlich des Vorliegens von vorzeitiger Pubertät, hormonabhängiger Neoplasie, Dysmenorrhoe und Endometriose zu hemmen.

Generell sind erfindungsgemäß Peptide synthetisiert worden, welche die Sekretion von Gonadotropinen durch die Hypophyse von Säugern einschließlich des Menschen stark hemmen und/oder die Freisetzung von Steroiden durch die Gonaden inhibieren. Bei diesen Peptiden handelt es sich um Analoga von GnFH, bei denen eine 1-Position-Substitution wie etwa β -(2-Naphthyl)-D-Alanin (im folgenden β -D-2NAL), eine 3-Position-Substitution wie etwa D-Trp, eine 5-Position-Substitution von Arg oder D-Arg für Tyr, eine 6-Position-D-Isomer-Substitution, wie sie im Fachgebiet allgemein bekannt ist, und ein spezifischer Substituent in der 2-Position vorliegt. Der 1-Position-Substituent kann derart modifiziert werden, daß seine Alpha-Aminogruppe Acetyl (Ac) oder Acrylyl (Acr) enthält, oder er kann auch unmodifiziert sein. Modifiziertes D-Phe liegt in der 2-Position vor und liefert gesteigerte antagonistische Aktivität als Resultat der im Benzenring vorliegenden spezifischen Modifikationen, dies insbesondere dann, wenn das Alpha-Kohlenstoffatom ebenfalls methyliert ist. Eine einzelne Substitution für Wasserstoff erfolgte in der Para- oder 4-Position, wobei Chlor und Fluor bevorzugt werden. Bevorzugt wird eine Doppelsubstitution im Rest, d. h. eine am Alpha-Kohlenstoffatom und die andere im Benzenring, z. B. C^oMe-4Cl-D-Phe. D-Tyr oder D-Arg ist vorzugsweise in der 6-Position vorhanden. Die Substitutionen in den 7- und 10-Positionen sind wahlfrei.

Da diese Peptide eine hohe Potenz im Sinne der LH-Freisetzungshemmung aufweisen, werden sie häufig als GnFH-Antagonisten bezeichnet. Die Peptide hemmen die Ovulation bei weiblichen Säugern nach Verabreichung in sehr geringen Dosierungen in der Proöstrus-Phase, sie sind desgleichen wirksam im Sinne der Hervorrufung einer Resorption von befruchteten Eiern, wenn die Verabreichung kurz nach der Konzeption erfolgt. Diese Peptide sind desgleichen wirksam bei der kontrazeptiven Behandlung von männlichen Säugern.

Die erfindungsgemäßen Peptide werden insbesondere durch die folgende Formel



repräsentiert, in welcher X für Wasserstoff, Acr oder Ac steht; R₁ ist β -D-2NAL, dehydroPro oder 4Cl-D-Phe; R₂ ist Cl-D-Phe, F-D-Phe oder C^oMe-Cl-D-Phe; R₃ ist D-Trp oder β -D-2NAL; R₅ ist Arg oder D-Arg; R₆ ist D-Tyr, β -D-2NAL oder D-Arg; R₇ ist Leu oder NML; und R₁₀ ist Gly-NH₂, NHCH₂CH₃ oder D-Ala-NH₂.

Mit β -D-NAL wird das durch Naphthyl auf dem β -Kohlenstoffatom substituierte D-Isomer von Alanin gemeint, welches auch mit 3-D-NAL bezeichnet werden kann. Vorzugsweise wird β -D-2NAL verwendet, was bedeutet, daß das β -Kohlenstoffatom an der 2-Position des Ringaufbaus an Naphthalen angelagert ist; β -D-1NAL wird jedoch als Äquivalent angesehen. Mit NML ist die Methyl-Substitution auf der Alpha-Aminogruppe von Leu gemeint.

Die erfindungsgemäßen Peptide können durch die klassische Lösungssynthese oder vermittels einer Festphasentechnik unter Verwendung eines chloromethylierten Harzes, eines Methylbenzhydrylamin-Harzes (MBHA) oder eines Benzhydrylamin-Harzes (BHA) synthetisiert werden. Die Festphasensynthese wird derart vorgenommen, daß die Aminosäuren schrittweise in der in US-PS 4211 693 detailliert dargelegten Weise in die Kette eingesetzt werden. Die im Fachgebiet weithin bekannten seitenkettenschützenden Gruppen werden vorzugsweise zu Ser, Tyr und Arg zugesetzt und können wahlweise zu Trp zugesetzt werden, bevor diese Aminosäuren an die auf dem Harz aufzubauende Kette angeknüpft werden. Eine derartige Methode liefert das vollständig geschützte intermediäre Peptidharz.

Die erfindungsgemäßen Intermediärprodukte können dargestellt werden als

$X^1-R_1-R_2-R_3(X^2)-Ser(X^3)-R_5(X^4)-R_6(X^4 \text{ oder } X^5)-R_7-Arg(X^5)-Pro-X^6$, wobei gilt: X¹ ist eine α -Amino schützende Gruppe des im Fachgebiet für die schrittweise Synthese von Polypeptiden als brauchbar bekannten Typs, und wenn X in der gewünschten Peptidzusammensetzung eine spezielle Acyl-Gruppe ist, dann kann jene Gruppe als die schützende Gruppe genutzt werden. Unter den von X¹ umfaßten Klassen von α -Amino schützenden Gruppen sind (1) schützende Gruppen des Acyl-Typs wie etwa Formyl (For), Trifluoroacetyl, Phthalyl, p-Toluensulfonyl (Tos), Benzoyl (Bz), Benzensulfonyl, o-Nitrophenylsulfenyl (Nps), Tritylsulfenyl, o-Nitrophenoxyacetyl, Acrylyl (Acr), Chloroacetyl, Acetyl (Ac) und γ -Chlorobutyryl; (2) aromatische schützende

Gruppen des Urethan-Typs, z. B. Benzyloxycarbonyl (Z) und substituiertes Benzyloxycarbonyl wie etwa p-Chlorobenzyloxycarbonyl, p-Nitrobenzyloxycarbonyl, p-Bromobenzyloxycarbonyl und p-Methoxy-benzyloxycarbonyl; (3) aliphatische schützende Urethan-Gruppen wie etwa Tertbutyloxycarbonyl (Boc), Diisopropylmethoxycarbonyl, Isopropylloxycarbonyl, Ethoxycarbonyl und Allyloxycarbonyl; (4) schützende Gruppen des Cycloalkyl-Urethan-Typs wie etwa Cyclopentylloxycarbonyl, Adamantylloxycarbonyl und Cyclohexylloxycarbonyl; (5) schützende Gruppen des Thiourethan-Typs wie etwa Phenylthiocarbonyl; (6) schützende Gruppen des Alkyl-Typs wie etwa Allyl (Aly), Triphenylmethyl(trityl) und Benzyl (Bzl); (7) Trialkylsilan-Gruppen wie etwa Trimethylsilan. Die bevorzugte α -Amino schützende Gruppe ist Boc, wenn X für Wasserstoff steht.

X^2 ist Wasserstoff oder eine schützende Gruppe für den Indol-Stickstoff wie etwa Formyl oder Benzyl; in vielen Synthesen besteht jedoch keine Notwendigkeit, Trp zu schützen.

X^3 ist Wasserstoff oder eine schützende Gruppe für die alkoholische Hydroxyl-Gruppe von Ser und wird unter Acetyl, Benzoyl, Tetrahydropyranyl, Tert-Butyl, Trityl, Benzyl und 2,6-Dichloro-benzyl ausgewählt. Benzyl wird bevorzugt.

X^4 ist Wasserstoff oder eine schützende Gruppe für die phenolische Hydroxyl-Gruppe von Tyr und wird ausgewählt unter Tetrahydropyranyl, tert-Butyl, Trityl, Benzyl, Benzyloxycarbonyl, 4-Bromobenzyloxycarbonyl und 2,6-Dichlorobenzyl. 2,6-Dichlorobenzyl wird bevorzugt.

X^5 ist eine schützende Gruppe für die Stickstoffatome von Arg und wird unter Nitro, Tos, Benzyloxycarbonyl, Adamantylloxycarbonyl und Boc ausgewählt; andererseits kann X^5 auch Wasserstoff sein, was bedeutet, daß sich auf den Seitenketten-Stickstoffatomen von Arginin keine schützenden Gruppen befinden. Tos wird bevorzugt.

X_6 wird unter jener Gruppe ausgewählt, welche sich zusammensetzt aus Gly-O-CH₂-[Harzträger]; O-CH₂-[Harzträger]; D-Ala-O-CH₂-[Harzträger]; Gly-NH-[Harzträger]; D-Ala-NH[Harzträger]; und OH, Ester, Amid und Hydrazid entweder von Gly oder D-Ala oder direkt an Pro angelagert.

Das Kriterium für die Auswahl von seitenkettenschützenden Gruppen für $X^2 \dots X^5$ besteht darin, daß die schützende Gruppe bei jedem Syntheseschritt unter den für die Beseitigung der α -Amino-schützenden Gruppe ausgewählten Reaktionsbedingungen gegenüber dem Reagenten stabil sein muß. Die schützende Gruppe darf unter Verknüpfungsbedingungen nicht abgespalten werden, und die schützende Gruppe muß nach Vollendung der Synthese der gewünschten Aminosäuresequenz unter Reaktionsbedingungen entfernbar sein, welche die Peptidkette nicht verändern.

Wenn es sich bei der X^6 -Gruppe um Gly-O-CH₂-[Harzträger], D-Ala-O-CH₂-[Harzträger] oder O-CH₂-[Harzträger] handelt, dann wird die Ester-Komponente von einer der zahlreichen funktionellen Gruppen des Polystyren-Harzträgerstoffes repräsentiert. Wenn es sich bei der X^6 -Gruppe um Gly-NH-[Harzträger] oder D-Ala-NH-[Harzträger] handelt, dann verknüpft eine Amid-Bindung Gly oder D-Ala mit dem BHA-Harz oder an ein MBHA-Harz.

Steht X in der letztendlichen Formel für Ac oder Acr, dann kann es möglich sein, dies als die X^1 -schützende Gruppe für die α -Aminogruppe von D-NAL zu nutzen, indem X vor dem Anknüpfen dieser letzten Aminosäure an die Peptidkette zugesetzt wird. Vorzugsweise wird jedoch eine Reaktion mit dem Peptid auf dem Harz (nach dem Entblockieren der α -Aminogruppe, während die Seitenkettengruppen geschützt bleiben) durchgeführt, dies beispielsweise durch Reagieren mit Essigsäure in Anwesenheit von Dicyclohexyl-carbodiimid (DCC) oder vorzugsweise mit Essigsäureanhydrid oder vermittels einer anderen geeigneten Reaktion, wie sie im Fachgebiet bekannt ist.

Das vollständig geschützte Peptid kann vermittels Ammonolyse von einem chloromethylierten Harzträgerstoff abgespalten werden, wie dies im Fachgebiet weithin bekannt ist, um auf diese Weise das vollständig geschützte Amid-Intermediärprodukt zu erbringen. Das Entschützen des Peptids wie auch die Abspaltung des Peptids von einem Benzhydrolamin-Harz kann bei 0°C mit Fluorwasserstoffsäure (HF) stattfinden. Vor der Behandlung mit HF wird dem Peptid vorzugsweise Anisol zugesetzt. Nach der unter Vakuum erfolgten Entfernung von HF wird das abgespaltene entschützte Peptid üblicherweise mit Ether behandelt, dekantiert, in verdünnter Essigsäure aufgenommen und lyophilisiert.

Die Reinigung des Peptids wird vermittels Ionenaustausch-Chromatographie auf einer CMC-Säule sowie mit nachfolgender Verteilungschromatographie unter Einsatz des folgenden Eluierungssystems vorgenommen: n-Butanol, 0,1N Essigsäure (1:1 Volumenverhältnis) auf einer mit Sephadex G-25 gepackten Säule, oder unter Anwendung von Hochdruck-Flüssigchromatographie, wie dies im Fachgebiet bekannt ist.

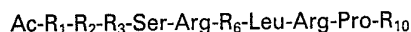
Die Erfindung vermittelt somit auch eine Methode zur Herstellung eines Peptids — oder eines davon abgeleiteten nichttoxischen Salzes — mit der Formel

$X-R_1-R_2-R_3-Ser-R_5-R_6-R_7-Arg-Pro-R_{10}$, in welcher X für Wasserstoff, Acr oder Ac steht; R_1 ist β -D-2NAL, dehydroPro oder 4Cl-D-Phe; R_2 ist Cl-D-Phe, F-d-Phe oder C⁶Me-Cl-D-Phe; R_3 ist D-Trp oder β -D-2NAL; R_5 ist Arg oder D-Arg; R_6 ist D-Tyr, β -D-2NAL oder D-Arg; R_7 ist Leu oder NML; und R_{10} ist Gly-NH₂, NHCH₂CH₃ oder D-Ala-NH₂, wobei sich die Methode zusammensetzt aus (a) dem Bilden einer Intermediärverbindung mit der Formel $X^1-R_1-R_2-R_3(X^2)-Ser(X^3)-R_5(X^5)-R_6(X^4 \text{ oder } X^5)-R_7-Arg(X^5)-Pro-X^6$, in welcher X^1 für Wasserstoff oder eine α -Amino schützende Gruppe steht; X^2 ist Wasserstoff oder eine schützende Gruppe für den Indolstickstoff von Trp; X^3 ist Wasserstoff oder eine schützende Gruppe für die alkoholische Hydroxylgruppe von Ser; X^4 ist Wasserstoff oder eine schützende Gruppe für die phenolische Hydroxylgruppe von Tyr; X^5 ist Wasserstoff oder eine schützende Gruppe für die Stickstoffatome von Arg; und X^6 wird ausgewählt unter Gly-O-CH₂-[Harzträger], O-CH₂-[Harzträger], D-Ala-O-CH₂-[Harzträger], Gly-NH-[Harzträger], D-Ala-NH-[Harzträger], Gly-NH₂, NHCH₂CH₃ sowie Estern, Amid und Hydraziden von Gly oder D-Ala; (b) dem Abspalten einer oder mehrerer der Gruppen X^1 bis X^5 und/oder dem Abspalten von irgendeinem in X^6 eingeschlossenen Harzträgerstoff sowie — sofern gewünscht — dem Umwandeln eines resultierenden Peptids in eines seiner nichttoxischen Salze.

Die erfindungsgemäßen Peptide sind wirksam bei Gaben von weniger als 100 Mikrogramm pro Kilogramm Körpermasse, wenn sie zwecks Ovulationsverhinderung bei weiblichen Ratten gegen Mittag des Proöstrus-Tages verabreicht werden. Für eine längeranhaltende Ovulationshemmung kann es sich als erforderlich erweisen, Dosierungen im Bereich von etwa 0,1 bis etwa 2,5 Milligramm pro Kilogramm Körpermasse zu verabreichen. Diese Antagonisten sind darüber hinaus als Kontrazeptiva wirksam, wenn sie regelmäßig an männliche Säuger verabreicht werden. Da diese Verbindungen die Testosteronspiegel reduzieren (eine unerwünschte Konsequenz beim normalen, sexuell aktiven männlichen Individuum), kann es sich als zweckmäßig erweisen, gemeinsam mit dem GnFH-Antagonisten Ersatzdosierungen von Testosteron zu verabreichen. Diese Antagonisten können darüber hinaus dazu genutzt werden, die Produktion von Gonadotropinen und Sexualsteroiden zu anderen als den oben genannten Zwecken zu regulieren.

Ausführungsbeispiel

Die Erfindung wird nachstehend an einem Beispiel näher erläutert.
Peptide, wie sie in der Tabelle angegeben werden und die die Formel



aufweisen, werden vermittle der weiter oben angeführten Festphasen-Prozedur hergestellt.

Tabelle 1

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₆	R ₁₀
1	β -D-2NAL	C ^α Me4Cl-D-Phe	D-Trp	D-Arg	D-Ala-NH ₂
2	β -D-2NAL	C ^α Me4Cl-D-Phe	D-Trp	D-Tyr	D-Ala-NH ₂
3	β -D-2NAL	C ^α Me4Cl-D-Phe	D-Trp	β -D-2NAL	D-Ala-NH ₂
4	β -D-2NAL	C ^α Me4Cl-D-Phe	D-Trp	D-Tyr	NHCH ₂ CH ₃
5	dehydroPro	C ^α Me4Cl-D-Phe	β -D-2NAL	β -D-2NAL	D-Ala-NH ₂
6	β -D-2NAL	C ^α Me4Cl-D-Phe	D-Trp	D-Tyr	Gly-NH ₂
7	β -D-2NAL	4Cl-D-Phe	D-Trp	D-Tyr	NHCH ₂ CH ₃
8	β -D-2NAL	4-F-D-Phe	D-Trp	D-Tyr	D-Ala-NH ₂
9	β -D-2NAL	4-F-D-Phe	D-Trp	D-Tyr	Gly-NH ₂ (N ^α MeLeu ⁷)
10	β -D-2NAL	4-F-D-Phe	D-Trp	D-Tyr	NHCH ₂ CH ₃
11	β -D-2NAL	4-F-D-Phe	β -D-2NAL	β -D-2NAL	Gly-NH ₂
12	dehydroPro	4-F-D-Phe	β -D-2NAL	β -D-2NAL	Gly-NH ₂
13	β -D-2NAL	4Cl-D-Phe	D-Trp	β -D-2NAL	D-Ala-NH ₂ (D-Arg ⁵)
14	β -D-2NAL	4Cl-D-Phe	D-Trp	D-Arg	D-Ala-NH ₂
15	4Cl-D-Phe	4Cl-D-Phe	D-Trp	β -D-2NAL	D-Ala-NH ₂

Zur Veranschaulichung wird im folgenden eine repräsentative Festphasensynthese des obigen Peptids Nr. 1 dargelegt, wobei das Peptid die Bezeichnung [Ac- β -D-2NAL¹, C^αMe-4Cl-D-Phe², D-Trp³, Arg⁵, D-Arg⁶, D-Ala¹⁰]-GnFH trägt. Dieses Peptid hat die folgende Formel: Ac- β -D-2NAL-C Me-4Cl-D-Phe-D-Trp-Ser-Arg-D-Arg-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂.

Verwendet wird ein BHA-Harz, und Boc-geschütztes D-Ala wird über eine Zeitspanne von 2h hinweg in CH₂Cl₂ an das Harz angeknüpft, wobei ein dreifacher Überschuß an Boc-Derivat und DCC als aktivierendes Agens verwendet wird. Der Alanin-Rest lagert sich dem BHA-Rest über eine Amid-Bindung an.

Nach dem Anknüpfen eines jeden Aminosäurerestes erfolgt das Waschen, Entblockieren und Anknüpfen des nächsten Aminosäurerestes entsprechend dem nachstehenden Muster unter Einsatz einer automatisierten Maschine, beginnend mit etwa 5g Harz:

SCHRITT	REAGENTEN UND OPERATIONEN	MISCHZEITEN min
1	CH ₂ Cl ₂ Wäsche — 80 ml (2mal)	3
2	Methanol(MeOH) Wäsche — 30 ml (2mal)	3
3	CH ₂ Cl ₂ Wäsche — 80 ml (3mal)	3
4	50 % TFA plus 5 % 1,2-Ethandithiol in CH ₂ Cl ₂ — 70 ml (2mal)	10
5	CH ₂ Cl Wäsche — 80 ml (2mal)	3
6	TEA 12,5 % in CH ₂ Cl ₂ — 70 ml (2mal)	5
7	MeOH Wäsche — 40 ml (2mal)	2
8	CH ₂ Cl ₂ Wäsche — 80 ml (3mal)	3
9	Boc-Aminosäure (10 mMol) in 30 ml entweder DMF oder CH ₂ Cl ₂ , je nach der Löslichkeit der einzelnen geschützten Aminosäure (1mal) + DCC (10 mMol) in CH ₂ Cl ₂	30 bis 300
10	MeOH Wäsche — 40 ml (2mal)	3
11	TEA 12,5 % in CH ₂ Cl ₂ — 70 ml (1mal)	3
12	MeOH Wäsche — 30 ml (2mal)	3
13	CH ₂ Cl ₂ Wäsche — 80 ml (2mal)	3

Bei manueller Durchführung der Synthese wird nach Schritt 13 eine aliquote Menge für einen Ninhydrintest entnommen: verläuft der Test negativ, dann wird zum Anknüpfen der nächsten Aminosäure zu Schritt 1 zurückgekehrt; verläuft der Test positiv oder leicht positiv, dann werden die Schritte 9 bis 13 wiederholt.

Das obige Muster wird für das Anknüpfen einer jeden der Aminosäuren des erfindungsgemäßen Peptids angewendet, nachdem die erste Aminosäure angelagert worden ist. Für jede der verbleibenden Aminosäuren wird über die Synthese hinweg ein N^oBoc-Schutz angewendet. N^oBoc-β-D-2NAL wird nach einem im Fachgebiet bekannten Verfahren hergestellt, z. B. nach dem detailliert in der US-PS 4234571 vom 18. November 1980 beschriebenen Verfahren. Die Seitenkette von Arg wird mit Tos geschützt. Beim Synthetisieren des Peptids Nr. 2 wird OBzl als eine seitenkettenschützende Gruppe für die Hydroxyl-Gruppe von Ser und 2-6 Dichlorobenzyl als die seitenkettenschützende Gruppe für die Hydroxyl-Gruppe von D-Tyr verwendet. Trp wird ungeschützt belassen. N^oBoc-β-D-2NAL wird als die abschließende Aminosäure eingeführt. Boc-Arg(Tos) und Boc-D-Trp, die eine niedrige Löslichkeit in CH₂Cl₂ aufweisen, werden unter Zuhilfenahme von DMF:CH₂Cl₂-Gemischen angeknüpft. Nach dem Entblockieren der Alphaaminogruppen am N-Terminal erfolgt die Acetylierung unter Verwendung eines großen Überschusses an Essigsäureanhydrid in Dichlormethan. Die Abspaltung des Peptids vom Harz sowie die vollständige Entschützung der Seitenketten vollzieht sich sehr leicht bei 0°C mit HF. Vor der HF-Behandlung wird Anisol als Reinigungsmittel zugesetzt. Nach der unter Vakuum erfolgenden Beseitigung von HF wird das Harz mit 50%iger Essigsäure extrahiert, und die Wäschen werden lyophilisiert, um ein rohes Peptidpulver zu ergeben.

Die Reinigung des Peptids erfolgt dann vermittels Ionenaustausch-Chromatographie auf CMC (Whatmann CM 32 unter Anwendung eines Gradienten von 0,05 bis 0,3M NH₄OAc in 50/50 Methanol/Wasser) sowie anschließend durch Verteilungschromatographie in einer Gel-Filtrationssäule unter Verwendung des Eluentensystems: n-Butanol; 0,1N Essigsäure (1:1 — Volumenverhältnis).

Der Nachweis der Homogenität des Peptids erfolgt vermittels Dünnschichtchromatographie sowie vermittels verschiedener Lösungsmittelsysteme wie auch unter Anwendung von Umkehrphasen-Hochdruckflüssigchromatographie sowie einer wäßrigen Triethylammoniumphosphat-Lösung plus Acetonitril. Die Aminosäureanalyse des resultierenden gereinigten Peptids stimmt mit der Formel für den hergestellten Aufbau überein, wobei sich für jede Aminosäure in der Kette im wesentlichen ganzzahlige Werte zeigen. Die optische Drehung wird mit einem photoelektrischen Polarimeter als $[\alpha]_D^{22} = -2,2^\circ \pm 1$ (c = 1, 50%ige Essigsäure) gemessen.

Die weiter oben beschriebenen Peptide werden *in vivo* geprüft, um ihre Wirksamkeit bei der Ovulationsverhinderung bei weiblichen Ratten zu ermitteln. Bei diesem Test werden einer vorgeschriebenen Anzahl von geschlechtsreifen weiblichen Sprague-Dawley-Ratten — d. h. zehn Tieren — mit je einer Körpermasse von 225 bis 250 g 10 Mikrogramm Peptid in Maiskeimöl gegen Mittag des Präöstrus-Tages injiziert. Präöstrus ist der Nachmittag vor dem Östrus (Ovulation). Eine separate Gruppe weiblicher Ratten wird als Kontrollgruppe verwendet, der kein Peptid verabreicht wird. Jede der weiblichen Kontroll-Ratten zeigt zur Brunst einen Eisprung; bei den behandelten Ratten kommt es zu keiner Ovulation. Im Ergebnis dessen wird das Peptid als beträchtlich wirksam bei der Ovulationsverhinderung an weiblichen Ratten bei Verabreichung in sehr geringer Dosis angesehen, als total wirksam gilt die Peptidanwendung in einer Dosis von etwa zehn Mikrogramm. Eine zusätzliche Prüfung kann auch mit niedrigeren oder höheren Dosierungen vorgenommen werden, wobei die in der folgenden Tabelle dargestellten Ergebnisse erzielt werden.

Tabelle 2

Peptid Nr.	$[\alpha]_D^{22}$	Dosis (μg)	in vivo	Anzahl ovulierender Tiere
1.	-2,2°	2,5		0/8
		1		9/10
2.	-9,9°	2,5		0/8
		1		9/10
3.	-13,5°	2,5		5/10
		1		6/6
12.	-77,9°	7,5		0/10
		2,5		6/10
13.	-24,7°	7,5		6/10
14.	-31,0°	25*		0/6
		5*		7/7
15.	-37,2°	7,5		4/10
		2,5		9/10

* in physiologischer Kochsalzlösung injiziert

Alle die Peptide werden als wirkungsvoll angesehen, die Ovulation von weiblichen Säugern bei Anwendung sehr niedriger Dosierungen zu verhindern. Diese Peptide können in Form pharmazeutisch annehmbarer nichttoxischer Salze wie etwa in Form von Säureadditionssalzen oder von Metallkomplexen z. B. mit Zink, Barium, Calcium, Magnesium, Aluminium oder dergleichen (die im Rahmen der vorliegenden Beschreibung als Säureadditionssalze angesehen werden) oder auch in Form von Kombinationen der beiden verabreicht werden. Als Beispiele für derartige Säureadditionssalze gelten Hydrochlorid, Hydrobromid, Sulfat, Phosphat, Nitrat, Oxalat, Fumarat, Gluconat, Tannat, Maleat, Acetat, Zitrat, Benzoat, Sukzinat, Alginat, Malat, Ascorbat, Tartrat und dergleichen. Soll der Wirkstoff in Tablettenform verabreicht werden, dann kann die Tablette einen pharmazeutisch annehmbaren Verdünnungsstoff enthalten, der seinerseits ein Bindemittel wie etwa Tragant, Maisstärke oder Gelatine; ein das Zerfallen förderndes Mittel wie etwa Alginsäure; und ein Schmälmittel wie etwa Magnesiumstearat beinhalten. Wird eine Verabreichung in flüssiger Form gewünscht, dann kann ein Süß- und/oder Geschmacksstoff als Teil des pharmazeutisch annehmbaren Verdünnungsmittels verwendet werden, wie auch eine intravenöse Verabreichung in isotonischer Kochsalzlösung, Phosphat-Pufferlösungen und dergleichen vorgenommen werden kann.

Die pharmazeutischen Zusammensetzungen werden das Peptid gewöhnlich im Zusammenhang mit einem konventionellen, pharmazeutisch annehmbaren Trägerstoff enthalten. Bei intravenöser Verabreichung wird die Dosierung gewöhnlich von etwa 1 bis zu etwa 100 Mikrogramm Peptid pro Kilogramm Körpermasse des Wirtsorganismus reichen; orale Verabreichungen werden in ihrer Dosierung höher liegen. Generell wird die Behandlung von Individuen mit diesen Peptiden in der gleichen Weise wie die klinische Behandlung unter Einsatz anderer GnFH-Antagonisten erfolgen.

Diese Peptide können an Säuger intravenös, subkutan, intramuskulär, oral, intranasal oder intravaginal verabreicht werden, um eine Fertilitätshemmung und/oder -kontrolle zu erreichen, wie sie auch im Sinne einer reversiblen Unterdrückung der Gonadentätigkeit wie etwa bei der Behandlung von Frühreife oder während einer Bestrahlungs- oder Chemotherapie eingesetzt werden können. Die wirksamen Dosen werden je nach Art der Verabreichung sowie je nach der im einzelnen zu behandelnden Säugerart variieren. Ein Beispiel für eine typische Dosierungsform ist eine das Peptid enthaltende physiologische Kochsalzlösung, welche verabreicht wird, um eine Dosis im Bereich von etwa 0,1 bis 2,5 mg/kg Körpermasse zu vermitteln. Die orale Verabreichung des Peptids kann entweder in fester oder in flüssiger Form erfolgen.

Wenn auch die Erfindung unter Bezug auf ihre bevorzugten Verkörperungen beschrieben worden ist, so sollte es sich von selbst verstehen, daß Abänderungen und Modifikationen, wie sie sich dem Fachmann auf diesem Gebiet anbieten, vorgenommen werden können, ohne daß damit vom Geltungsbereich der Erfindung abgewichen wird, wie er in den folgenden Patentansprüchen zum Ausdruck kommt. Beispielsweise können andere — im Fachgebiet bekannte — Substitutionen, die die Wirksamkeit der Peptide nicht beeinträchtigen, an den erfindungsgemäßen Peptiden vorgenommen werden. Beispielsweise gelten Gly-OCH₃, Gly-OCH₂CH₃, Gly-NHNH₂ und Sar-NH₂ (Sar = Sarkosin) als Äquivalente der für R₁₀ spezifizierten Reste. Spezielle Merkmale der Erfindung werden in den nachstehenden Patentansprüchen betont.