(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 326 861**

(51) Int. Cl.:
***C07K 7/23*** (2006.01)
***A61K 38/09*** (2006.01)
***A61P 5/04*** (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **01204149 .7**
(96) Fecha de presentación : **07.06.1996**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1188768**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **20.03.2002**

(54) Título: **Péptidos antagonistas de LHRH.**

(30) Prioridad: **07.06.1995 US 480494**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
**21.10.2009**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
**21.10.2009**

(73) Titular/es: **Indiana University Research and Technology Corporation**
**351 West 10th Street**
**Indianapolis, Indiana 46202, US**

(72) Inventor/es: **Roeske, Roger W.**

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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).



Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

## DESCRIPCIÓN

Péptidos antagonistas de LHRH.

### Antecedentes de la invención

La presente invención se refiere a péptidos antagonistas de LHRH y sus usos.

La hormona luteinizante (LH) y la hormona estimulante de los folículos (FSH) son hormonas liberadas por la glándula pituitaria. Estas hormonas regulan el funcionamiento de las gónadas y la producción y maduración de los gametos. La LH y la FSH en general son liberadas por la glándula pituitaria después de la liberación de una hormona de activación desde el hipotálamo. La hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH, también conocida como hormona liberadora de gonadotropina o GnRH) es una de las principales hormonas hipotalámicas que activa la liberación de la LH. Por tanto, la liberación de LHRH representa un punto de control en la regulación fisiológica de la función gonadal. Se ha determinado la estructura de la LHRH de mamíferos, y se ha descubierto que es un decapéptido:

p-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-$NH_2$ (SEQ ID NO: 1)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

La liberación de LH es necesaria para la ovulación; por tanto, los compuestos que inhiben la liberación de la LH bloqueando la acción de la LHRH son útiles como agentes anticonceptivos. Los antagonistas de LHRH también son útiles para regular la secreción de gonadotropinas en machos de mamíferos y, por tanto, pueden utilizarse como anticonceptivos masculinos. Además, los antagonistas de LHRH pueden utilizarse en el tratamiento de cánceres dependientes de hormonas sexuales (por ejemplo, el cáncer de próstata), en los que un mayor nivel de gonadotropinas aumenta la velocidad de crecimiento tumoral.

Se han sintetizado muchos péptidos análogos de LHRH modificados para intentar aumentar la potencia de los antagonistas, aumentando también preferiblemente la resistencia del antagonista a la degradación enzimática. Por ejemplo, se han ensayado péptidos antagonistas de LHRH sintéticos que incorporan aminoácidos modificados o no naturales. Las sustituciones habituales incluyen, por ejemplo, una sustitución de His por 4-Cl-D-Phe en la posición 2, o la sustitución de Gly-$NH_2$ por D-Ala-$NH_2$ en la posición 10.

Un problema que se produce con frecuencia en los péptidos antagonistas de LHRH es la aparición de actividad liberadora de histamina. Esta actividad liberadora de histamina representa un grave obstáculo para el uso clínico de estos antagonistas, porque la liberación de histamina produce unos efectos secundarios adversos como edema y picor. Por tanto, los péptidos antagonistas de LHRH que presentan una baja actividad liberadora de histamina resultan particularmente deseables. Aunque el antagonista de LHRH y las propiedades liberadoras de histamina no están necesariamente relacionados, muy pocos compuestos de la técnica anterior combinan una baja actividad liberadora de histamina con una elevada actividad antagonista de LHRH. Muchos péptidos antagonistas de LHRH de la técnica anterior también presentan baja solubilidad en agua, que complica la formulación del antagonista para la administración.

Octa- y nonapéptidos que son análogos antagonistas de LHR1-1 se describen en los documentos FR-A-2329294 y FRA-A-2329293.

Se describen una serie de octa- y nonapéptidos de des-$His^2$ anágolos de LHRH con modificaciones en las posiciones 1 y 6 y, en algunos casos, la posición 10, en Edgren *et al* J. Med. Chem. (1979) 22, 935-943.

### Compendio de la invención

Un aspecto de la invención proporciona un antagonista de LHRH tal como se muestra en la reivindicación 1. Más preferiblemente, el compuesto peptídico comprende 10 restos.

Un compuesto peptídico puede comprender una estructura:

A-B-C-D-E-F-G-H-I-J

donde

A es piro-Glu, Ac-D-Nal, Ac-D-Qal, Ac-Sar o Ac-D-Pal;

B es His o 4-Cl-D-Phe;

C es Trp, D-Pal, D-Nal, L-Nal-D-Pal(N-O) o D-Trp;

D es Ser;

E es N-Me-Ala, Tyr, N-Me-Tyr, Ser, Lys(iPr), 4-Cl-Phe, His, Asn, Met, Ala, Arg o Ile;

F es D/L-Asn o L-Gln;

G es Leu o Trp;

H es Lys(iPr), Gln, Met o Arg;

I es Pro; y

J es D-Ala-$NH_2$;

o su sal farmacéuticamente aceptable.

La descripción también proporciona composiciones farmacéuticas de los péptidos antagonistas de LHRH.

Un método para inhibir la actividad de LHRH en un individuo, puede comprender administrar a un individuo una cantidad eficaz de un antagonista de LHRH, se forma que la actividad de LHRH es inhibida.

Un método para inhibir la actividad de LHRH en una célula, puede comprender poner en contacto una célula con un antagonista de LHRH, de forma que la actividad de LHRH es inhibida.

Un método para inhibir el crecimiento de un tumor dependiente de hormonas en un individuo, puede comprender administrar a un individuo una cantidad eficaz de un antagonista de LHRH, de forma que el crecimiento del tumor es inhibido.

Un método para inhibir la ovulación en un individuo, puede comprender administrar a un individuo una cantidad eficaz de un antagonista de LHRH, de forma que la ovulación es inhibida.

Una formulación empaquetada para tratar a un individuo con una enfermedad asociada a la actividad de LHRH puede comprender un antagonista de LHRH empaquetado con instrucciones para usar el antagonista de LHRH para tratar un individuo que tiene un trastorno asociado ala actividad de LHRH.

**Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 es una gráfica que muestra los niveles de testosterona plasmática (en ng/ml) en ratas macho adultas a las que se le administraron ocho inyecciones subcutáneas del antagonista de LHRH #3827, una inyección cada tres horas, en dosis de 1, 10 ó 100 $\mu$g/kg.

La figura 2 es una gráfica que muestra los niveles de testosterona plasmática (en ng/ml) en ratas macho adultas a las que se le administró por vía subcutánea el antagonista de LHRH #3827, mediante una bomba osmótica. Las dosis eran 300 $\mu$g/kg/día durante dos semanas, seguido de 15 $\mu$g/kg/día durante dos semanas más, o 1000 $\mu$g/kg/día durante dos semanas, seguido de 5, 15 ó 50 $\mu$g/kg/día durante dos semanas más.

La figura 3 es una gráfica que muestra los niveles de testosterona plasmática (en ng/ml) en ratas macho adultas a las que se le administró por vía subcutánea el antagonista de LHRH #3827, mediante una bomba osmótica. Las dosis eran 30 $\mu$g/kg/día durante dos semanas, seguido de 5 $\mu$g/kg/día durante dos semanas más, 100 $\mu$g/kg/día durante dos semanas, seguido de 5 $\mu$g/kg/día durante dos semanas más, o 300 $\mu$g/kg/día durante dos semanas, seguido de 0 ó 5 $\mu$g/kg/día durante dos semanas más.

**Descripción detallada de la invención**

Con el fin de que la presente invención y descripción puedan entenderse con más facilidad, se definen ciertos términos en primer lugar.

Tal como se utiliza en la presente, se pretende que un "péptido antagonista de LHRH" incluya péptidos y análogos de péptidos que inhiben la actividad LHRH (es decir, tienen "actividad antagonista de LHRH") *in vivo* o *in vitro*. Los péptidos antagonistas de LHRH candidatos pueden ensayarse, por ejemplo, en el modelo animal descrito en Corbin y Beattie, *Endocrine Res. Commun.*, 2:1 (1975) (y véase a continuación). En este ensayo, la actividad antagonista de LHRH de un compuesto candidato se ensaya midiendo la actividad antiovulatoria (AOA) del compuesto en ratas.

La expresión "actividad liberadora de histamina", tal como se utiliza en la presente, hace referencia a la tendencia de un compuesto a liberar histamina cuando se administra a un sujeto. La actividad liberadora de histamina de un compuesto puede medirse con un ensayo *in vitro* (descrito con más detalle a continuación). Los péptidos antagonistas de LHRH preferidos tienen elevada actividad en el ensayo de actividad antiovulatoria en ratas, pero una baja actividad

liberadora de histamina. Los péptidos antagonistas de LHRH preferidos tienen una $ED_{50}$ en el ensayo de liberación de histamina de al menos 3 $\mu$g/ml, más preferiblemente al menos 5 $\mu$g/ml, y aún más preferiblemente al menos 10 $\mu$g/ml.

La expresión "alquilo", tal como se utiliza en la presente, hace referencia a un grupo hidrocarbonado de cadena lineal o ramificada que tiene desde aproximadamente 1 a aproximadamente 10 átomos de carbono. La expresión "alquilo inferior" hace referencia a un grupo alquilo que tiene desde aproximadamente 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos alquilo inferior incluyen metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, n-pentilo y n-hexilo. Un grupo alquilo puede estar no sustituido, o puede estar sustituido en una o más posiciones con, por ejemplo, halógenos, alquilos, cicloalquilos, alquenilos, alquinilos, arilos, heterociclos, hidroxilos, aminos, nitros, tioles, aminas, iminas, amidas, fosfonatos, fosfinas, carbonilos, carboxilos, sililos, éteres, tioéteres, sulfonilos, selenoéteres, cetonas, aldehídos, ésteres, $-CF_3$, -CN o similares. Los alquilos preferidos son alquilos inferiores.

La expresión "cicloalquilo" hace referencia a un grupo hidrocarbonado saturado cíclico que tiene de 3 a 8 átomos de carbono. Los ejemplos de cicloalquilos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y ciclooctilo. Los grupos cicloalquilo pueden estar no sustituidos, o sustituidos en una o más posiciones del anillo como se ha descrito para los alquilos. Por tanto, un cicloalquilo puede estar sustituido con, por ejemplo, halógenos, alquilos, cicloalquilos, alquenilos, alquinilos, arilos, heterociclos, hidroxilos, aminos, nitros, tioles, aminas, iminas, amidas, fosfonatos, fosfinas, carbonilos, carboxilos, sililos, éteres, tioéteres, sulfonilos, selenoéteres, cetonas, aldehídos, ésteres, $-CF_3$, -CN o similares.

Las expresiones "alquenilo" y "alquinilo", tal como se utilizan en la presente, hacen referencia a grupos insaturados, análogos en longitud y sustituciones posibles a los alquilos descritos anteriormente, pero que contienen al menos un enlace carbono-carbono doble o triple, respectivamente.

La expresión "arilo", tal como se utiliza en la presente, incluye grupos aromáticos de anillo único de 4, 5, 6 y 7 eslabones, que pueden incluir desde cero a cuatro heteroátomos, por ejemplo, benceno, pirrol, furano, tiofeno, imidazol, oxazol, tiazol, triazol, tetrazol, pirazol, piridina, pirazina, piridazina y pirimidina, y similares. Los grupos arilo que tienen heteroátomos en la estructura del anillo también pueden denominarse "arilo heterocíclico" o "heteroaromático". El anillo aromático puede estar sustituido en una o más posiciones del anillo con los sustituyentes descritos anteriormente, como por ejemplo, halógenos, alquilos, cicloalquilos, alquenilos, alquinilos, heterociclos, hidroxilos, aminos, nitros, tioles, aminas, iminas, amidas, fosfonatos, fosfinas, carbonilos, carboxilos, sililos, éteres, tioéteres, sulfonilos, selenoéteres, cetonas, aldehídos, ésteres, $-CF_3$, -CN o similares. Un anillo aromático también puede estar sustituido con otro anillo aromático, como por ejemplo un bifenilo. Los grupos arilo también incluyen sistemas aromáticos condensados o policíclicos.

Las expresiones "heterociclo" o "grupo heterocíclico" hacen referencia a estructuras de anillo de 4 a 10 eslabones, más preferiblemente a anillos de 5 a 7 eslabones, y estas estructuras de anillo incluyen de uno a cuatro heteroátomos. Los grupos heterocíclicos incluyen pirrolidina, oxolano, tiolano, imidazol, oxazol, piperidina, piperazina, morfolina. El anillo heterocíclico puede estar sustituido en una o más posiciones con los sustituyentes descritos anteriormente, como por ejemplo, halógenos, alquilos, cicloalquilos, alquenilos, alquinilos, arilos, otros heterociclos, hidroxilo, amino, nitro, tiol, aminas, iminas, amidas, fosfonatos, fosfinas, carbonilos, carboxilos, sililos, éteres, tioéteres, sulfonilos, selenoéteres, cetonas, aldehídos, ésteres, $-CF_3$, -CN o similares. Los heterociclos también puede estar enlazados o condensados con otros grupos cíclicos como se describe a continuación.

Las expresiones "policiclo" o "grupo policíclico" hacen referencia a dos o más anillos cíclicos (por ejemplo, cicloalquilos, cicloalquenilos, cicloalquinilos, arilos y/o hterociclos), en los que dos o más carbonos son comunes a dos anillos contiguos, por ejemplo, los anillos son "anillos condensados". Los anillos que están unidos a través de átomos no adyacentes se denominan anillos "enlazados". Cada uno de los anillos del policiclo puede estar sustituido con los sustituyentes descritos anteriormente, como por ejemplo, halógenos, alquilos, cicloalquilos, alquenilos, alquinilos, hidroxilo, amino, nitro, tiol, aminas, iminas, amidas, fosfonatos, fosfinas, carbonilos, carboxilos, sililos, éteres, tioéteres, sulfonilos, selenoéteres, cetonas, aldehídos, ésteres, $-CF_3$, -CN o similares.

La expresión "heteroátomo", tal como se utiliza en la presente, significa un átomo de cualquier elemento que no sea carbono o hidrógeno. Los heteroátomos preferidos son nitrógeno, oxígeno, azufre, fósforo y selenio.

La expresión "arilalquilo", tal como se utiliza en la presente, hace referencia a un grupo arilo unido a un grupo alquilo que incluye, pero no está limitada a bencilo, naftilmetilo, piridilmetilo y similares.

La expresión "iluro" se conoce en la técnica, y hace referencia a un resto en el que un átomo de carga positiva (en especial de los grupos V y VI de la tabla periódica) se une a un átomo de carbono que porta un par de electrones desapareados. Por tanto, un iluro tiene las formas resonantes:

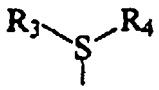


en las que W es un heteroátomo como S o P, y $R^1$ y $R^2$ son independientemente H, alquilo, cicloalquilos, alquenilo, alquinilo, arilo, alcoxi, tioalcoxi y similares. El heteroátomo se sustituye con un número apropiado de sustituyentes (es decir, dos para N y S, y tres para P); los sustituyentes son independientemente alquilo, cicloalquilo, arilo y similares. Los iluros de nitrógeno no tienen una contribución significativa en la forma de resonancia sin separación de cargas (a la derecha, arriba).

La expresión "resto dipolar", tal como se utiliza en la presente, hace referencia a un resto unido de forma covalente que tiene cargas positivas y negativas (por ejemplo, un resto bipolar). Los ejemplos de grupos dipolares incluyen iluros (por ejemplo, de S, N o P), óxidos de aminas terciarias, nitronas, piridin-N-óxidos, óxidos de nitrilo, aminoácidos cuaternarios (por ejemplo, acetato de 2-(N,N,N-trialquilamonio)), aminoácidos, arenoóxidos de sulfonio (como se describen, por ejemplo, en la patente de EEUU 4.111.914), betaínas (por ejemplo, trigonelina) y similares. En ciertas realizaciones preferidas, el resto dipolar es piridin-N-óxido. En otras realizaciones preferidas, el resto dipolar es un resto piridinio bipolar. En ciertas otras realizaciones, el resto dipolar no es un resto piridinio bipolar.

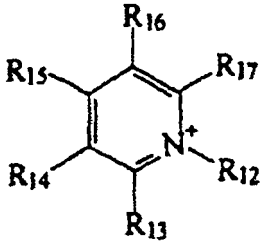
Tal como se utiliza en la presente, un "resto catiónico" es un resto en el que al menos un átomo porta una carga positiva, y el resto tiene un carga neta positiva. Así, por ejemplo, un resto piridinio de N-alquilo (o N-alquenilo, -alquinilo o -arilo, denominados colectivamente en la presente "piridinio N-sustituido") puede ser un resto catiónico (y se denomina en la presente "resto piridinio catiónico"), pero un piridin-N-óxido no lo es, a menos que tenga una carga neta positiva. Como se ha descritos anteriormente, un piridin-N-óxido puede ser un resto dipolar. Otros ejemplos de restos catiónicos incluyen aminas cuaternarias, sales sulfónicas, sales fosfónicas y similares. En ciertas realizaciones preferidas, el resto catiónico es un resto sulfonio.

Un resto sulfonio tiene la siguientes estructura:




en la que $R_3$ y $R_4$ son cada uno independientemente alquilo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo, arilo y similares.

En otras realizaciones preferidas, el resto catiónico es un resto piridinio catiónico. Un resto piridinio catiónico tiene la siguiente estructura:

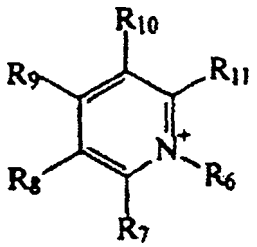



en la que $R_{12}$ es alquilo o arilo, y $R_{13}$-$R_{17}$ son cada uno independientemente hidrógeno, halógenos, alquilos, cicloalquilos, alquenilos, alquinilos, arilos, otros heterociclos, hidroxilo, amino, nitro, tiol, aminas, iminas, amidas, fosfonatos, fosfinas, carbonilos, carboxilos, sililos, éteres, tioéteres, sulfonilos, selenoéteres, cetonas, aldehídos, ésteres, $-CF_3$, -CN o similares. Los restos piridinio catiónicos preferidos incluyen Pal(iPr) y Pal(Bzl). Los restos N-metilpiridinio no son preferidos.

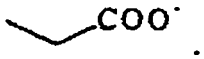
Aunque los ejemplos anteriores describen restos piridina (o piridinio), un experto en la técnica sabe que pueden utilizarse otros restos N-heteroaromáticos (es decir, un resto en el que al menos está presente un nitrógeno en un anillo aromático) en lugar de los restos piridina (o piridinio) descritos en la presente. Los ejemplos de restos N-heteroaromáticos incluyen tiazol, triazol, tetrazol, pirazol, pirazina, piridazina, pirimidina y similares. Por tanto, se contemplan las pirazinas y piridazinas N-sustituidas y similares para su uso en la presente invención.

Tal como se utiliza en la presente, una "amina terciaria" incluye aminas trialquílicas, aminas triarílicas y aminas que tienen sustituyentes alquilo y arilo.

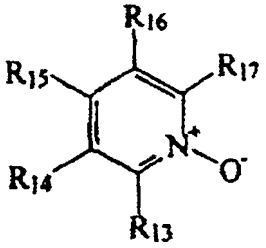
Tal como se utiliza en la presente, un "resto piridinio bipolar" hace referencia a un resto que tiene la forma:




en la que $R_6$ comprende un resto alquilo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo o arilo, y $R_7$-$R_{11}$ son cada uno independientemente hidrógeno, halógenos, alquilos, cicloalquilos, alquenilos, alquinilos, arilos, otros heterociclos, hidroxilo, amino, nitro, tiol, aminas, iminas, amidas, fosfonatos, fosfinas, carbonilos, carboxilos, sililos, éteres, tioéteres, sulfonilos, selenoéteres, cetonas, aldehídos, ésteres, -$CF_3$, -CN o similares, con la condición de que al menos uno de $R_6$-$R_{11}$ está sustituido con un resto aniónico. Un "resto aniónico", tal como se utiliza en la presente, es un resto que tiene una carga neta negativa. Se elige el resto aniónico para que sea compatible con otros restos y para que forme un compuesto estable. Los ejemplos de restos aniónicos incluyen carboxilatos, fosfatos, fosfonatos, sulfatos, sulfonatos y similares. En ciertas realizaciones preferidas, el resto aniónico es un carboxilato. En otras realizaciones preferidas, el resto aniónico es un sulfonato. En una realización preferida, $R_6$ comprende:

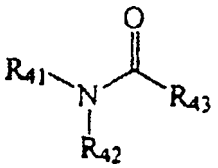



Un piridin-N-óxido es un resto que tiene la forma:




en la que $R_{13}$-$R_{17}$ tiene los significados definidos anteriormente.

La expresión "resto N-acilo hidrófilo", tal como se utiliza en la presente, hace referencia a un resto que comprende un átomo de nitrógeno acilado para formar un resto hidrófilo. Por tanto, un resto N-acilo hidrófilo puede tener la forma:




en la que $R_{41}$ y $R_{42}$ son cada uno independientemente H, alquilo, cicloalquilo, arilo y similares; y $R_{43}$ es alquilo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo, arilo y similares; y $R_{41}$-$R_{43}$ se seleccionan para formar un resto hidrófilo. En las realizaciones preferidas, $R_{41}$ y $R_{42}$ no son ambos H.

La hidrofilicidad relativa puede determinarse mediante uno cualquiera de una serie de métodos conocidos en la técnica (Hansch, ed., "Comprehensive Medicinal Chemistry", vol. 4, Pergamon Press, Oxford, 1990), y puede utilizarse para la elección de los restos hidrófilos potenciales para su uso en la invención. Se ha utilizado el coeficiente de partición, P, entre 1-octanol y agua como referencia para medir la hidrofilicidad de un compuesto. La hidrofilicidad puede expresarse como log P, el logaritmo del coeficiente de partición (Hansch *et al.*, *Nature*, 194:178 (1962); Fujite *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 86:5175 (1964)). Se han compilado las tablas de patrones de hidrofilicidad para muchas moléculas y las constantes de lipofilicidad (hidrofobicidad) de sustituyentes (denominadas $\pi$) para muchos grupos funcionales (véase, por ejemplo, Hansch y Leo, "Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology", Wiley, Nueva York (1979)). La hidrofilicidad de un amplio grupo de candidatos de restos de hidrofilicidad puede predecirse con bastante precisión con la ayuda de estas tablas. Por ejemplo, el log P medido (octanol/agua) del naftaleno es 3,45. La constante de sustituyente p para -OH es -0,67. Por tanto, el log P predicho para $\beta$-naftol es 3,45 + (-0,67) = 2,78. Este valor está bastante de acuerdo con el log P medido para $\beta$-naftol, que es 2,84. En ciertas realizaciones preferidas, el resto N-acilo hidrófilo tiene un valor de log P entre -1 y +2, más preferiblemente entre -0,5 y +1,5.

La expresión "resto polar pequeño" hace referencia a un resto que tiene un pequeño volumen estérico y es relativamente polar. En ciertas realizaciones, un resto polar pequeño no es D-Cit, D-Hci o sus derivados de alquilo inferior. La polaridad se mide como hidrofobicidad mediante la escala P descrita anteriormente. En ciertas realizaciones preferidas, los restos polares pequeños tienen un log P entre -1 y +2. En las realizaciones particularmente preferidas, el resto polar pequeño modifica el resto 6. En las realizaciones preferidas, el volumen estérico de un resto polar pequeño es menor que el volumen estérico de Trp. Los ejemplos de restos que incorporan restos polares pequeños preferidos son D- o L-Asn, y L-Gln. En una realización especialmente preferida, el resto polar pequeño es D-Asn.

La expresión "grupo saliente" se conoce en la técnica y tal como se utiliza en la presente, hace referencia a una funcionalidad que tras una ruptura del enlace heterolítica se separa con una pareja de electrones. En general, los grupos salientes adecuados son los restos que se separan del sustrato como bases débiles, con o sin carga. Por ejemplo, sulfatos, sulfonatos, sulfuros, cloruro, bromuro, yoduro, fosfatos, fosfinatos y similares son buenos grupos salientes. En otras palabras, cuando, por ejemplo, se rompe un enlace C-S de un resto sulfonio, se separa un sulfuro (con una pareja de electrones).

La expresión "resto modificador de receptor", tal como se utiliza en la presente, hace referencia a un resto que puede modificar, de forma covalente o no covalente, un receptor para un péptido antagonista de LHRH. Por ejemplo, en fechas recientes se ha demostrado (C.A. Flanagan *et al*., (1994) *J. Biol. Chem.*, 269:22636) que Glu301 del receptor de LHRH de ratón (que se corresponde con Asp301 en el receptor de LHRH humano) interacciona con $Arg^8$ en agonistas de LHRH. Por tanto, un reactivo modificador de carboxilato (como un agente alquilante) puede modificar Glu301 (Asp301) y, por tanto, modificar el receptor de LHRH de ratón (o humano). Un resto modificador de receptor también puede actuar para unir el péptido antagonista de LHRH al receptor (por ejemplo, esterificando el antagonista con el receptor mediante el desplazamiento de un grupo saliente), o puede modificar el receptor sin unir el péptido antagonista de LHRH al receptor (por ejemplo, mediante metilación con un resto metilsulfonio). Otros restos de un receptor de LHRH también pueden modificarse, y los restos que pueden modificar estos restos también son restos modificadores de receptor. Los ejemplos de reactivos modificadores de receptor incluye haluros de alquilo y bencilo (por ejemplo, yoduro de metilo o bromuro de bencilo), $\alpha$-halocetonas, $\alpha$-haloésteres y $\alpha$-haloamidas (que se denominan colectivamente "$\alpha$-halocarbonilos"), sales sulfónicas, sulfatos, sulfonatos de alquilo o arilo, y otros reactivos que comprenden un grupo saliente adecuado, como se ha descrito anteriormente. Otros reactivos modificadores de receptor se describen, por ejemplo, en A.J. Barrett y G. Salvesen, eds., (1986) "Proteinase Inhibitors", *Research Monographs in Cell and Tissue Physiology*, vol. 12, Elsevier Press, Amsterdam.

Un antagonista de LHRH puede contener un resto modificador de receptor, la descripción no se limita a estos antagonistas que realmente modifican un resto del receptor. Un antagonista de LHRH que comprende un resto modificador de receptor, pero que no modifica realmente el receptor, puede, no obstante, ser un antagonista de LHRH eficaz. Sin embargo, para aquellos antagonistas que modifican un resto del receptor, una ventaja es que estos restos pueden diseñarse para modificar de modo selectivo sólo el receptor diana, reduciendo con ello las reacciones no específicas y disminuyendo la probabilidad de efectos secundarios tóxicos.

La expresión "un péptido que tiene una cadena lateral modificada por" un resto, tal como se utiliza en la presente, hace referencia a un péptido (o un mimético de péptido, véase a continuación), en el que al menos un resto tiene una cadena lateral que comprende este resto. Así, por ejemplo, un "péptido que tiene una cadena lateral modificada por un resto dipolar" significa un péptido en el que al menos una cadena lateral comprende un resto dipolar.

Los péptidos antagonistas de LHRH también incluyen análogos de péptidos y miméticos de péptidos. La expresión "compuesto peptídico", tal como se utiliza en la presente, incluye péptidos, análogos de péptidos, derivados de péptidos y miméticos de péptidos. Las expresiones "análogo de péptido", "derivado de péptido" y "mimético de péptido", tal como se utiliza en la presente, incluyen moléculas que imitan la estructura química de un péptido y mantienen las propiedades funcionales del péptido. Un "resto" hace referencia a un aminoácido o un mimético de aminoácido incorporado al compuesto peptídico mediante un enlace amida o un mimético de enlace amida. Los enfoques al diseño de análogos peptídicos son conocidos en la técnica. Por ejemplo, véase Farmer, P.S. en *Drug Design* (E.J. Ariens, ed.), Academic Press, Nueva York, 1980, vol. 10, pp. 119-143; Ball, J.B. y Alewood, P.F. (1990), *J. Mol. Recognition*, 3:55; Morgan, B.A. y Gainor, J.A. (1989), *Ann. Rep. Med. Chem.*, 24:243; y Freidinger, R.M. (1989), *Trends Pharmacol. Sci.*, 10:270.

Un "mimético de aminoácido" hace referencia a un resto, diferente de un aminoácido que aparece en la naturaleza, que actúa de modo conformacional y funcional como sustituto para un aminoácido concreto en un compuesto peptídico sin interferir de forma adversa, en un grado significativo, con la función del péptido (por ejemplo, la interacción del péptido con un receptor de LHRH). En algunas circunstancias, la sustitución con un mimético de aminoácido puede realmente potenciar las propiedades del péptido (por ejemplo, la interacción del péptido con un receptor de LHRH). Los ejemplos de miméticos de aminoácidos incluyen los D-aminoácidos. Los péptidos antagonistas de LHRH sustituidos con uno o más D-aminoácidos pueden prepararse utilizando procedimientos de síntesis peptídica bien conocidos. El efecto de la sustituciones de aminoácidos por D-aminoácidos u otros miméticos de aminoácidos puede ensayarse utilizando ensayos, por ejemplo, los ensayos AOA y de liberación de histamina según se describe a continuación. Otros métodos para determinar el efecto de una sustitución con un mimético de aminoácido serán evidentes para un experto en la técnica.

Los análogos o miméticos de péptidos incluyen los isósteros. La expresión "isóstero", tal como se utiliza en la presente, hace referencia a una secuencia de dos o más restos que pueden sustituirse por una segunda secuencia,

debido a que la conformación estérica de la primera secuencia se ajusta a un sitio de unión específico para la segunda secuencia. La expresión incluye de modo específico modificaciones en el esqueleto del péptido (es decir, mimétidos de enlace amídico) muy conocidas por los expertos en la técnica. Estas modificaciones incluyen modificaciones del nitrógeno amídico, el $\alpha$-carbono, el carbonilo amídico, la sustitución completa del enlace amídico, las extensiones, deleciones o entrecruzamientos del esqueleto. Se conocen varias modificaciones del esqueleto peptídico, incluyendo $\Psi[CH_2S]$, $\Psi[CH_2NH]$, $\Psi[C(S)NH_2]$, $\Psi$[NHCO], $\Psi[C(O)CH_2]$ y $\Psi$[(E) o (Z) CH=CH]. En la nomenclatura utilizada, $\Psi$ indica la ausencia de un enlace amídico. La estructura que sustituye el grupo amida se especifica entre corchetes. Otros ejemplos de isósteros incluyen péptidos sustituidos con una o más moléculas de benzodiazepina (véase, por ejemplo, James, G.L. *et al*. (1993), *Science*, 260:1937-1942).

Otras posibles modificaciones incluyen una sustitución N-alquílica (o arílica) ($\Psi$[CONR]), entrecruzamientos del esqueleto para construir lactamas y otras estructuras cíclicas, o la incorporación de aminoácidos retroinversa ($\Psi$[NHCO]). Por "inversa" se quiere dar a entender la sustitución de L-aminoácidos de una secuencia por D-aminoácidos, y por "retroinversa" o "enantiorretro" se quiere dar a entender la inversión de la secuencia de los aminoácidos ("retro") y la sustitución de los L-aminoácidos por D-aminoácidos. Por ejemplo, si el péptido de origen es Thr-Ala-Tyr, la forma retromodificada es Tyr-Ala-Thr, la forma inversa es thr-ala-tyr, y la forma retroinversa es tyr-ala-thr (las letras en minúscula hacen referencia a D-aminoácidos). Comparado con el péptido de origen, un péptido retroinverso tiene un esqueleto invertido pero mantiene sustancialmente la conformación espacial de las cadenas laterales, dando como resultado un isómero retroinverso con una topología que se parece mucho al péptido de origen, y es capaz de unirse al receptor de LHRH seleccionado. Véase Goodman *et al*., "*Perspectives in Peptide Chemistry*", pp. 283-294 (1981). Véase también la patente de EEUU nº 4.522.752 de Sisto, para una descripción más a fondo de los péptidos "retroinversos".

Además de los péptidos antagonistas de LHRH con sustitución de aminoácidos, la descripción también incluye compuestos peptídicos antagonistas de LHRH que tienen otras modificaciones. Por ejemplo, el extremo amino-terminal o carboxi-terminal del péptido puede modificarse. Se pretende que la expresión "grupo derivado de amino" incluya modificaciones del extremo amino-terminal de los compuestos peptídicos de la invención. Los ejemplos de modificaciones N-terminales incluyen grupos alquilo, cicloalquilo, arilo, arilalquilo y acilo. Una modificación N-terminal preferida es la acetilación. El resto N-terminal puede estar unido a una diversidad de restos que no son aminoácidos, como polietilenglicoles (como tetraetilenglicol ácido carboxílico monometil éter), ácido piroglutámico, succinoílo, metoxisuccinoílo, benzoílo, fenilacetilo, 2-, 3- o 4-piridilalcanoílo, aroílo, alcanoílo (incluyendo acetilo y cicloalcanoílo, por ejemplo, ciclohexilpropanoílo), arilalcanoílo, arilaminocarbonilo, alquilaminocarbonilo, cicloalquilaminocarbonilo, alquiloxicarbonilo (remates de carbamato) y cicloalcoxicarbonilo, entre otros.

Se pretende que la expresión "grupo derivado de carboxi" incluya modificaciones carboxi terminales de los compuestos peptídicos de la descripción. Los ejemplos de modificaciones del extremo C-terminal incluyen modificaciones del carbono carbonílico del resto C-terminal para formar una amida o alcohol carboxi-terminal (es decir, una forma reducida). En general, el nitrógeno amídico, que está unido de modo covalente al carbono carbonílico en el resto C-terminal, tendrá dos grupos de sustitución, cada uno de los cuales puede ser hidrógeno, alquilo o un grupo alquilarilo (sustituido o no sustituido). Preferiblemente, el extremo C-terminal es un grupo amido, como $-CONH_2$, $-CONHCH_3$, $-CONHCH_2C_6H_5$ o $-CON(CH_3)_2$, más preferiblemente $-CONH_2$, pero también puede ser 2-, 3- o 4-piridilmetilo, 2-, 3- o 4-piridiletilo, ácido carboxílico, éteres, ésteres carbonílicos, alquilo, arilalquilo, arilo, ciclohexilamida, piperidinamida, otras amidas mono- o disustituidas, ureas o carbamatos. Otros restos que pueden unirse al resto C-terminal incluyen amida o ácido piperidin-4-carboxílico, y amida o ácido cis- o trans-4-aminociclohexanocarboxílico.

Las formas modificadas de los péptidos antagonistas de LHRH de la descripción, incluyendo las sustituciones de L- o D-aminoácidos, la modificación covalente del extremo terminal o de las cadenas laterales, y los análogos y miméticos de péptidos pueden seleccionarse para lograr las alteraciones deseadas de las propiedades físicas o químicas del péptido, por ejemplo, mayor estabilidad, solubilidad, biodisponibilidad, mayor o menor inmunogenicidad, etc. Los péptidos pueden dirigirse a órganos concretos (por ejemplo, el cerebro) mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, el vehículo de dihidropiridina-piridinio de Bodor (véase, por ejemplo, la patente de EEUU 4.540.564). Cuando se desea una cadena lateral modificada por un resto piridinio, se incorpora la correspondiente cadena lateral de dihidropiridina N-alquilada en el péptido. Cuando el péptido se administra a un sujeto, la cadena lateral de dihidropiridina N-alquilada se oxida *in vivo* para producir el resto piridinio deseado.

Los péptidos antagonistas de LHRH preferidos varían en longitud desde aproximadamente 8 aproximadamente 12 restos, más preferiblemente desde 9 a 11 restos, y lo más preferible, tienen una longitud de 10 restos.

Los péptidos antagonistas de LHRH pueden prepararse mediante cualquier método adecuado para la síntesis peptídica, incluyendo la síntesis química de fase en disolución y de fase sólida. Preferiblemente, los péptidos se sintetizan sobre un soporte sólido. Los métodos para sintetizar péptidos de forma química son muy conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Bodansky, M., *Principles of Peptide Synthesis*, Springer Verlag, Berlín (1993), y Grant, G.A. (ed.), *Synthetic Peptides: A User's Guide*, W.H. Freeman and Company, Nueva York (1992). Los sintetizadores de péptidos automáticos pueden adquirirse en el mercado.

La utilización de bancos combinatorios para identificar ligandos ya se emplea mucho (véase, por ejemplo, M.A. Gallop *et al*., (1994) *J. Med. Chem.*, 37:1233; y E.M. Gordon *et al*., (1994) *J. Med. Chem.*, 37:1385; y las referencias citadas en éstos). Por tanto, los péptidos antagonistas de LHRH pueden identificarse mediante síntesis química (por ejemplo, en fase de disolución o sólida) de bancos combinatorios (por ejemplo, de péptidos o peptoides), y la búsqueda

en los bancos resultantes según técnicas conocidas. Por tanto, pueden sintetizarse muchos ligandos potenciales y realizar una búsqueda en un corto periodo de tiempo, y los ligandos más activos pueden seleccionarse para volver a ensayarse o para utilizarse.

En esta descripción se usan las abreviaturas y convenciones convencionales cuando se describen los péptidos. Los péptidos se escriben con el extremo N-terminal a la izquierda, y el extremo carboxilo terminal a la derecha. Los aminoácidos están en la forma L, a menos que se indique lo contrario, por ejemplo, D-Lys significa la forma D de la lisina. Ac-Xaa significa que el resto N-terminal Xaa está N-acetilado; las amidas C-terminales se indican como Xaa-$NH_2$. En la tabla 1, sólo se indican los restos que se diferencian de la LHRH nativa de mamífero; por tanto, la notación Met($S^+$Me)$^8$-LHRH.TFA indica un péptido que se diferencia de la LHRH nativa de mamífero sólo en la sustitución de la Arg nativa en la posición 8 por Met($S^+$Me) (TFA indica la sal trifluoroacetato). Lys(iPr) indica N-$\varepsilon$-2-propil-lisinilo; otros restos alquilantes y acilantes se indican de forma similar. Así, por ejemplo, Met(S+$CH_2C_6H_5$) indica S-bencilmetionina. Ciertos otros restos no convencionales se abrevian como sigue:

| Abreviatura | Resto |
|---|---|
| pGlu | piroglutamilo |
| Nal | 3-(2-naftil)alaninilo |
| Ada | 3-(1-adamantanil)alaninilo |
| 4-Cl-Phe | (4'-clorofenil)alaninilo |
| Qal | 3-(2'-quinolinil)alaninilo |
| Pal | 3-(3'-piridil)alaninilo |
| Pal(N-O) | 3-(3'-piridin-N-oxido)alaninilo |
| Pal(iPr) | 3-(N-(2-propil)-3'-piridinio)alaninilo |
| Pal(Bzl) | 3-(N-(bencil)-3'-piridinio)alaninilo |
| Pal($CH_2COO^-$) | 3-(3'-piridinio-N-(2-acetato))alaninilo |
| Lys(iPr) | N-$\varepsilon$-2-propil-lisinilo |
| Imdac | 2-oxo-4-imidazolinilo |
| Otac | 2-oxo-4-tiazolinilo |
| Ppic | 3-(piperidin-1-il)-propanoílo |
| Dodac | 2,5-dioxo-4-imidazolinilo |
| Met($S^+$Me) | S-metilmetioninilo |
| PEG | polietilenglicol |
| Cit | citrulinilo |
| Hci | homocitrulinilo |
| Glu(taurina) | 5-(2-sulfoetilamido)glutamilo |
| Pyz | 1,4-pirazincarbonilo |
| Pip | pipecolilo |
| CNa | (2-ciano)acetilo |
| Dea | dietilamida |
| Onic | 3-nicotinil-N-óxido |
| Glc | gluconato |

| | |
|---|---|
| Orotic | orotato |
| Orn | ornitina |
| Dap | 2,4-diaminopropionilo |

1. *Péptidos antagonistas de LHRH*

En un aspecto, la descripción trata de péptidos antagonistas de LHRH.

Un antagonista de LHRH comprende un compuesto peptídico, donde un resto del compuesto peptídico que se corresponde con el aminoácido en la posición 6 de la LHRH natural de mamífero comprende un pequeño resto polar de forma que el compuesto peptídico tiene una actividad antagonista de LHRH tal como se definen la reivindicación 1.

Preferiblemente, el antagonista tiene una actividad anti-ovulatoria de menos de aproximadamente 1 $\mu$g por rata en un ensayo de ovulación en rata y/o el antagonista tiene una $ED_{50}$ en un ensayo de liberación de histamina de al menos aproximadamente 5 $\mu$g/ml. Preferiblemente, el compuesto peptídico comprende 10 restos.

El compuesto peptídico puede comprender una estructura:

A-B-C-D-E-F-G-H-I-J

donde

A es piro-Glu, Ac-D-Nal, Ac-D-Qal, Ac-Sar o Ac-D-Pal;

B es His o 4-Cl-D-Phe;

C es Trp, D-Pal, D-Nal, L-Nal, D-Pal(N-O) o D-Trp;

D es Ser;

E es N-Me-Ala, Tyr, N-Me-Tyr, Ser, Lys(iPr), 4-Cl-Phe, His, Asn, Met, Ala, Arg o Ile;

F es D/L-Asn o L-Gln;

G es Leu o Trp;

H es Lys(iPr), Gln, Met o Arg;

I es Pro; y

J es D-Ala-$NH_2$;

o su sal farmacéuticamente aceptable.

La descripción proporciona compuestos peptídicos de las siguientes estructuras:

Ac-D-Nal-4-Cl-D-Phe-D-Pal-Ser-N-Me-Tyr-D-Asn-Leu-Lys(iPr)-Pro-D-Ala-$NH_2$; y sus sales farmacéuticamente aceptables.

Ac-D-Nal-4-Cl-D-Phe-D-Pal-Ser-Tyr-D-Asn-Leu-Lys(iPr)-Pro-D-Ala-$NH_2$; y sus sales farmacéuticamente aceptables.

II. *Composiciones farmacéuticas*

Los péptidos antagonistas de LHRH descritos pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración a un sujeto. En una realización preferida, la composición farmacéutica comprende un péptido antagonista de LHRH de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Una “cantidad terapéuticamente eficaz” hace referencia a una cantidad eficaz, en dosificaciones y periodos de tiempos necesarios, para lograr el resultado deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido antagonista de LHRH de la presente invención puede variar según factores como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad del antagonista para producir una respuesta deseada en el individuo. Los regímenes de posología pueden ajustarse para proporcionar la óptima respuesta terapéutica. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es aquella en la que los efectos terapéuticamente beneficiosos son más importantes que cualquier efecto tóxico

o perjudicial del antagonista. Un intervalo no limitante para la cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de LHRH es 0,01 $\mu$g/kg-10 mg/kg, preferiblemente entre aproximadamente 0,01 y 5 mg/kg. Debe notarse que los valores de posología pueden variar con la gravedad del trastorno que se va a aliviar. También debe comprenderse que para cualquier sujeto concreto, los regímenes de posología específicos deben ajustarse a lo largo del tiempo según la necesidad del individuo y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de posología que se indican en la presente son sólo ejemplos y no se pretende que limiten el alcance o la práctica de la composición reivindicada.

Tal como se utiliza en la presente, un "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cualquier disolvente, medio de dispersión, revestimiento, agente antibacteriano y antifúngico, agente isotónico y de retraso en la absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. Preferiblemente, el vehículo es adecuado para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea o parenteral (por ejemplo, mediante inyección). Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo puede revestirse con un material para proteger al compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

Una "sal farmacéuticamente aceptable" hace referencia a una sal que mantiene la actividad biológica deseada del compuesto de origen, y que no imparte efectos toxicológicos no deseados. Los ejemplos de estas sales son sales de ácidos como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido nítrico y similares; ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido málico, ácido benzoico, ácido pamoico, ácido algínico, ácido metanosulfónico, ácido naftalenosulfónico y similares. También se incluyen las sales de cationes como sodio, potasio, litio, cinc, cobre, bario, bismuto, calcio y similares; o cationes orgánicos como trialquilamonio. También son útiles las combinaciones de las sales anteriores.

Un antagonista de LHRH-R puede administrarse mediante una diversidad de métodos conocidos en la técnica. En una realización preferida, el antagonista de LHRH-R se administra en una formulación de liberación a lo largo del tiempo, por ejemplo en una composición que incluye un polímero de liberación lenta, o mediante inyección depot. Los compuestos activos pueden prepararse con vehículos que protegen al compuesto contra la liberación rápida, como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de administración microencapsulados. Pueden utilizarse polímeros biodegradables y biocompatibles, como acetato de etilenvinilo, polianhídridos, poli(ácido glicólico), colágeno, poliortoésteres, poli(ácido láctico) y copolímeros de poliláctico y poliglicólico (PLG). Muchos métodos para la preparación de estas formulaciones están patentados o en general son conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978. Las formulaciones particularmente preferidas incluyen las composiciones de liberación controlada, como las conocidas en la técnica para la administración de leuprolida (nombre comercial: Lupron$^{R}$), por ejemplo microcápsulas (patentes de EEUU 4.652.441 y 4.917.893), formulaciones inyectables (patente de EEUU 4.849.228), copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico útiles para la fabricación de microcápsulas o formulaciones inyectables (patentes de EEUU 4.677.191 y 4.728.721), y composiciones para la liberación sostenida para polipéptidos solubles en agua (patente de EEUU 4.675.189).

Cuando se formula de forma apropiada, un antagonista de LHRH puede administrarse por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable. Los antagonistas de LHRH y otros ingredientes también pueden introducirse en una cápsula de gelatina de cubierta dura o blanda, pueden comprimirse en comprimidos, o incorporarse directamente en la dieta del sujeto. Para la administración terapéutica oral, los antagonistas de LHRH pueden incorporarse con excipientes y emplearse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. El porcentaje de antagonistas de LHRH en las composiciones y preparaciones, por supuesto, puede variarse. La cantidad de antagonistas de LHRH en estas composiciones terapéuticamente útiles debe ser tal que se obtenga una posología adecuada.

Para administrar los antagonistas de LHRH mediante una vía de administración que no sea la parenteral, puede ser necesario revestir el compuesto, o coadministrar el compuesto, con un material para evitar su inactivación. Por ejemplo, los antagonistas de LHRH pueden administrarse a un sujeto en un vehículo apropiado, por ejemplo liposomas o un diluyente. Los diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen disoluciones salinas y tampón acuosas. Los liposomas incluyen emulsiones de CGF de agua-en-aceite-en-agua, así como los liposomas convencionales (Stejan *et al*., (1984), *J. Neuroimmunol.*, 7:27). Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles, y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de estos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es muy conocido en la técnica. En tanto que el medio o agente convencional no sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones farmacéuticas de la invención. También pueden incorporarse en las composiciones otros compuestos activos.

Las composiciones terapéuticas de forma típica deben ser estériles y estables bajo las condiciones de fabricación y conservación. La composición puede formularse como una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una elevada concentración del fármaco. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y propilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, con el uso de una cubierta tal como lecitina, mantenimiento el tamaño de partícula necesario en el caso de dispersión y el uso de tensioactivos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, o cloruro sódico en la composición. Puede lograrse una absorción prolongada de las composiciones inyectables incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Pueden prepararse disoluciones inyectables estériles mediante la incorporación del compuesto activo (por ejemplo, antagonistas de LHRH) en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno, o una combinación, de los ingredientes enumerados anteriormente, como se requiera, seguido de esterilización mediante filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son el secado al vacío y la liofilización que produce un polvo del ingrediente activo, más cualquier otro ingrediente deseado a partir de una disolución del mismo que previamente se ha esterilizado mediante filtración.

Los regímenes de posología pueden ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, puede administrarse una única píldora grande, pueden administrarse varias dosis divididas a lo largo del tiempo, o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente según indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Resulta especialmente ventajoso formular las composiciones parenterales en una forma de posología unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la posología. La forma de posología unitaria, tal como se utiliza en la presente, hace referencia a unidades físicamente discretas, adecuadas para dosificaciones unitarias a los sujetos mamíferos que se van a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo, calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas de posología unitaria de la invención viene dictada y depende directamente de (a) las características exclusivas del compuesto activo y el efecto terapéutico concreto que se quiere lograr, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de formar compuestos, como un compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

III. *Método para utilizar los antagonistas de LHRH*

Los péptidos antagonistas de LHRH descritos son útiles para el tratamiento de trastornos como la pubertad precoz, el cáncer de próstata, el cáncer de ovario, la hipertrofia prostática benigna, la endometriosis, los fibroides uterinos, el cáncer de mama, el síndrome premenstrual, el síndrome de ovario poliquístico, y las enfermedades que se producen por un exceso de hormonas gonadales en humanos o animales de ambos sexos. Los péptidos antagonistas de LHRH también son útiles para la modificación del comportamiento (por ejemplo, la "castración química"). Los péptidos antagonistas de LHRH también son útiles para controlar la reproducción en machos y hembras. Además, los péptidos pueden utilizarse para tratar pacientes inmunosuprimidos, como se describe, por ejemplo, en la patente de EEUU 5.003.011.

Un método para inhibir la actividad de LHRH en un individuo, puede comprender administrar a un individuo una cantidad eficaz de un antagonista de LHRH, se forma que la actividad de LHRH es inhibida.

Un método para inhibir la actividad de LHRH en una célula, puede comprender poner en contacto una célula con un antagonista de LHRH, de sorma que la actividad de LHRH es inhibida.

Un método para inhibir el crecimiento de un tumor dependiente de hormonas en un individuo, puede comprender administrar a un individuo una cantidad eficaz de un antagonista de LHRH, de forma que el crecimiento del tumor es inhibido. Un antagonista de LHRH puede ser administrado a un individuo que padece cáncer de próstata para inhibir el crecimiento del tumor prostático.

Un método para inhibir la ovulación en un individuo, puede comprender administrar a un individuo una cantidad eficaz de un antagonista de LHRH, de forma que la ovulación es inhibida.

Una formulación empaquetada para tratar a un individuo con una enfermedad asociada a la actividad de LHRH puede comprender un antagonista de LHRH empaquetado con instrucciones para usar el antagonista de LHRH para tratar un individuo que tiene un trastorno asociado ala actividad de LHRH.

Los compuestos peptídicos pueden ser usados en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno en el que la inhibición de la actividad de LHRH es beneficiosa. Por ejemplo, el trastorno en que la inhibición de LHRH es beneficiosa puede seleccionarse del grupo que consiste en pubertad precoz, cáncer de próstata, cáncer de ovario, hipertrofia prostática benigna, endometriosis, fibroides uterinos, cáncer de mama, síndrome premenstrual, síndrome de ovario poliquístico, y enfermedades que se producen por un exceso de hormonas gonadales.

Los siguientes ejemplos ilustrativos no deben considerarse limitantes.

En los ejemplos se emplean las siguientes abreviaturas:

Boc: N-t-butoxicarbonilo

HOBt: 1-hidroxibenzotriazol

MCPBA: ácido m-cloroperbenzoico

DCC: diciclohexilcarbodiimida

Ejemplo 1

*Actividad Anti-ovulatoria y de Liberación de Histamina de los Antagonistas de LHRH*

Se midió la actividad anti-ovulatoria (AOA) mediante un ensayo *in vivo* en ratas, como se describe en Corbin y Beattie, *Endocrine Res. Commun.*, 2:1 (1975). De forma breve, se inyectaron ratas hembra con un antagonista de LHRH candidato en el día del proestro; en general, el antagonista de LHRH candidato se disolvió en DMSO al 0,1%. Se midió la capacidad del péptido candidato para inhibir la ovulación mediante la determinación del número de ratas que ovulan. Se considera que un péptido candidato tiene cualidades de antagonista de LHRH si inhibe la ovulación en al menos 50% de las ratas tratadas con una dosis de 5 $\mu$g por rata. Los antagonistas de LHRH preferidos inhiben la ovulación en al menos 50% de las ratas a una dosis de 2 $\mu$g por rata, más preferiblemente a una dosis de 1 $\mu$g por rata, y aún más preferiblemente a una dosis de 0,5 $\mu$g por rata.

Se ensayó la actividad de liberación de histamina mediante el método descrito en la patente de EEUU 4.851.385 de Roeske. De forma breve, se añadió una suspensión de células cebadas de rata a concentraciones crecientes de un péptido antagonista de LHRH y se incubó durante 15 minutos a 37ºC. El tampón contiene PIPES 25 mM, pH 7,4, NaCl (119 mM), KCl (5 mM), NaOH (40 mM), glucosa (5,6 mM), $CaCl_2$ (1 mM) y albúmina de suero bovino al 0,1%. La reacción se detuvo mediante centrifugación a 400 x g durante 15 minutos a 4ºC, y el sobrenadante se ensayó para determinar el contenido en histamina mediante un método publicado (Siriganian (1974), *Anal. Biochem.*, 57:383, y Siriganian y Hook (1986), en "Manual of Clinical Immunology", 3ª ed., N.R. Rose, H. Friedman y J.L. Fahey, eds., p. 808), o mediante un método manual que produce resultados similares. La máxima liberación de histamina se produce con rapidez, de forma típica en menos de un minuto. No se observaron evidencias de toxicidad celular en ninguno de los péptidos ensayados. La actividad liberadora de histamina de los péptidos se midió como $ED_{50}$ en $\mu$g/ml; una $ED_{50}$ mayor representa una menor liberación de histamina.

En la tabla 1 se resumen las actividades AOA y de liberación de histamina de varios péptidos. Los compuestos con una x son compuestos de comparación.

TABLA 1

*Antagonistas de LHRH*

| Compuesto | Secuencia | Actividad AO (AOA) | Liberación de Histamina |
|---|---|---|---|
| 3341 x | Ac-D-Nal[1],4-Cl-D-Phe[2], D-Pal[3], D-Gln[6]-Lys(iPr)[8], D-Ala[10]-LHRH.TFA | 4/10@1 µg 2/10@2 µg | 106 |
| 3342 | Ac-D-Nal[1], 4-Cl-D-Phe[2], D-Pal[3], D-Asn[6]-Lys(iPr)[8], D-Ala[10]-LHRH.TFA | 2/10@2 µg | 126 |
| 3343 x | Ac-D-Nal[1], 4-Cl-D-Phe[2], D-Pal[3], D-Thr[6]-Lys(iPr)[8], D-Ala[10]-LHRH.TFA | 5/10@1 µg | 62 |
| 3344 x | Ac-D-Nal[1], 4-Cl-D-Phe[2], D-Pal[3], D-Cit[6]-Lys(iPr)[8], Pip[9]-D-Ala[10]-LHRH.TFA | 9/10@1 µg | 32 |
| 3361 x | Ac-D-Nal[1], 4-Cl-D-Phe[2], D-Pal[3], D-Glu(Taurine)[6]-Lys(iPr)[8], D-Ala[10]-LHRH.TFA | 1/8@5 µg | 131 |
| 3362 x | Ac-D-Nal[1], 4-Cl-D-Phe[2], D-Pal[3], D-Cit[6]-Lys(iPr)[8]-LHRH.TFA | 4/8@1 µg | 22 |
| 3363 x | Ac-D-Nal[1], 4-Cl-D-Phe[2], D-Pal[3], D-Cit[6]-Lys(iPr)[8], Pip[9]-LHRH.TFA | 6/8@1 µg | 25 |
| 3364 x | Ac-D-Nal[1],4-Cl-D-Phe[2], D-Pal[3], D-Phe(4-$NO_2$)[6]-Lys(iPr)[8], D-Ala[10]-LHRH.TFA | 6/8@1 µg | 14 |
| 3365 x | Ac-D-Nal[1], 4-Cl-D-Phe[2], D-Pal[3], D-Cit[6]-Lys(iPr)[8], ProNHEt[9]-des-Gly[10]-LHRH.TFA | | 24 |

| Compuesto | Secuencia | Actividad AO (AOA) | Liberación de Histamina |
|---|---|---|---|
| 3366 x | Ac-D-(or L)-9-anthryl-Ala[1], 4-Cl-D-Phe[2], D-Pal[3], D-Cit[6]-Lys(iPr)[8], D-Ala[10]-LHRH.TFA | 6/8@5 µg | |
| 3367 x | Ac-L-(or D)-9-anthryl-Ala[1], 4-Cl-D-Phe[2], D-Pal[3], D-Cit[6]-Lys(iPr)[8], D-Ala[10]-LHRH,TFA | 7/8@5 µg | |
| 3763 x | Ac-Sar[1],4-Cl-D-Phe[2],D-Nal[3],D-Pal(Bzl)[6], Lys(iPr)[8],D-Ala[10]-LHRH.2TFA | 4/8@1,0 | 102[1], 76[b] |
| 3769 x | Ac-Sar[1],4-Cl-D-Phe[2],1-1-Nal[3],D-Pal(Bzl)[6], Lys(iPr)8,D-Ala[10]-LHRH.2TFA | 6/8@1,0 | |
| 3770 x | Ac-D-Nal[1],4-Cl-D-Phe[2],D-Pal[3],D-Pal($CH_2COOH$)[6],Lys(iPr)[8],D-Ala[10]-LHRH.TFA | 6/8@1,0 0,1DMSO | |
| 3771 x | Ac-D-Nal[1],4-Cl-D-Phe[2],D-Pal[3],D-Lys(Ala)[6], Lys(iPr)[8],D-Ala[10]-LHRH.TFA | 7/8@1,0 | |
| 3772 x | Ac-Sar[1],4-Cl-D-Phe[2],D-1-Nal[3],D-Pal(iPr)[6], Lys(iPr)[8],D-Ala[10]-LHRH.2TFA | 8/8@1,0 | |
| 3773 x | Ac-Sar[1],4-Cl-D-Phe[2],L-1-Nal[3],D-Pal(iPr)[6], Lys(iPr)[8],D-Ala[10]-LHRH.2TFA | 7/8@1,0 | |
| 3785 x | Ac-D-Qal[1],4-Cl-D-Phe[2],D-Pal[3],D-Lys(Gulonyl)[6],Lys(iPr)[8],D-Ala[10]-LHRH.TFA | 7/8@1,0 0,1DMSO | |
| 3786 x | Ac-D-Nal[1],4-Cl-D-Phe[2],D-Pal[3],D-Pal(N-O)[6], Lys(iPr)[8],D-Ala[10]-LHRH.TFA | 4/8@1,0 | |
| 3787 x | Ac-D-Qal[1],4-Cl-D-Phe[2],D-Pal[3],D-Lys(Ppic)[6], Lys(iPr)[8],D-Ala[10]-LHRH.TFA | 7/8@1,0 | |
| 3800 x | Ac-D-Qal[1],4-Cl-D-Phe[2],D-Pal[3],D-Lys(Imdac)[6], Lys(iPr)[8],D-Ala[10]-LHRH.TFA | 7/8@1,0 | |
| 3801 x | Ac-D-Qal[1],4-Cl-D-Phe[2],D-Pal[3],D-Lys(Onic)[6], Lys(iPr)[8],D-Ala[10]-LHRH.TFA | 8/8@1,0 | |
| 3802 x | Ac-D-Qal[1],4-Cl-D-Phe[2],D-Pal[3],D-Lys(Otac)[6], Lys(iPr)[8],D-Ala[10]-LHRH.TFA | 5/8@1,0 | |
| 3803 x | Ac-D-Nal[1],4-Cl-D-Phe[2],D-Pal[3],D-Lys(Dodac)[6], Lys(iPr)[8],D-Ala[10]-LHRH.TFA | 2/8@1,0 | |
| 3804 x | Ac-D-Pal[1],4-Cl-D-Phe[2]-D-Pal[3],D-Pal(iPr)[6], Lys(iPr)[8],D-Ala[10]-LHRH.2TFA | 8/8@1,0 | |
| 3827 | Ac-D-Nal[1],4-Cl-D-Phe[2],D-Pal[3],N-Me-Tyr[5],D-Asn[6],Lys(iPr)[8],D-Ala[10]-LHRH.TFA | 4/8@1,0 | |
| 3828 x | Ac-D-Nal[1],4-Cl-D-Phe[2],D-Pal[3],N-Me-Tyr[5],D-Lys(Onic)[8],Lys(iPr)[8],D-Ala10-LHRH.TFA | 4/8@1,0 | 42[a], 39[b] |
| 3829 x | Ac-D-Nal[1],4-Cl-D-Phe[2],D-Pal[3],N-Me-Tyr[5],D-Lys(Ac)[6],Lys(iPr)[8],D-Ala[10]-LHRH.TFA | 8/8@1,0 | |
| 3852 x | Ac-D-Nal[1] 4-Cl-D-Phe[2] D-Pal[3] Lys(iPr)[5] D- | 8/8@5,0 | |

| Compuesto | Secuencia | Actividad AO (AOA) | Liberación de Histamina |
|---|---|---|---|
| | $His^6$,$Trp^7$,$Orn^8$,D-$Ala^{10}$-LHRH.TFA | | |
| 3853 x | Ac-D-$Nal^1$,4-Cl-D-$Phe^2$,D-$Pal^3$,$His^5$,D-$Arg^6$, $Trp^7$,$Orn^8$,D-$Ala^{10}$-LHRH.TFA | 0/8@5,0 | |
| 3854 x | Ac-D-$Nal^1$,4-Cl-D-$Phe^2$,D-$Pal^3$,$Arg^5$,D-$His^6$, $Trp^7$,$Orn^8$,D-$Ala^{10}$-LHRH.TFA | 6/8@5,0 | |
| 3855 x | Ac-D-$Nal^1$,4-Cl-D-$Phe^2$,D-$Pal^3$,$Lys(iPr)^5$,D-$Trp^6$,$Trp^7$,$Orn^8$,D-$Ala^{10}$-LHRH.TFA | 4/8@1,0 | |
| 3851 x | Ac-D-$Nal^1$,4-Cl-D-$Phe^2$,D-$Pal^3$,4-Cl-$Phe^5$,D-$Pal(iPr)^6$,$Lys(iPr)^8$,D-$Ala^{10}$-LHRH.2TFA | 0/8@1,0<br>6/8@0,5 | $4,1^a$, $5,4^b$ |
| 3882 x | Ac-D-$Nal^1$,4-Cl-D-$Phe^2$,D-$Pal(N\text{-}O)^3$,D-$Pal(iPr)^6$,$Lys(iPr)^8$,D-$Ala^{10}$-LHRH.2TFA | 6/8@1,0 | |
| 4014 x | Ac-D-$Nal^1$,4-Cl-D-$Phe^2$,D-$Pal^3$,D-$Lys(COCH_2S^+Me_2)^6$,D-$Ala^{10}$-LHRH.2TFA | 0/8@1,00 | |
| 4015 x | Ac-D-$Nal^1$,4-Cl-D-$Phe^2$,D-$Pal^3$,D-$Arg^6$, $Lys(COCH_2S+Me_2)^8$,D-$Ala^{10}$-LHRH.2TFA | 1/8@1,00 | |
| 4016 x | Ac-D-$Nal^1$,4-Cl-D-$Phe^2$,D-$Pal^3$,D-$Met(S^+Me)^6$, $Met(S^+Me)^8$,D-$Ala^{10}$-LHRH.2TFA | 6/8@1,00 | |
| 4013 x | Ac-D-$Nal^1$,4-Cl-D-$Phe^2$,D-$Pal^3$,D-$Orn(COCH_2S^+Me_2)^6$,D-$Ala^{10}$-LHRH.2TFA | 0/8@1,00 | |
| 4023 x | Ac-D-$Nal^1$,4-Cl-D-$Phe^2$,D-$Pal^3$,D-$Arg^6$, $Dap(COCH_2S^+Me_2)^8$,D-$Ala^{10}$-LHRH.2TFA | 0/8@1,00 | |

x = el análisis de espectro de no confirmó la estructura,
Valores de liberación de Histamina Nal arg (referencia): a=0,11, b=0,14.

Los compuestos que tienen un resto polar pequeño en la posición 6 mostraron combinaciones favorables de AOA y actividad liberadora de histamina. Por ejemplo, el compuesto 3827, que tiene D-Asn (un resto hidrófilo pequeño) en la posición 6 mostró una actividad AO moderada. Los compuestos 3341, 3342 y 3343 con D-Gln, D-Asn y D-Thr, respectivamente, combinan una AOA moderada con una liberación de histamina muy baja. El compuesto 3361, que tiene una taurina amida de Glu en la posición 6, también mostró una liberación de histamina muy baja. El compuesto 3369, que tiene D-Cit en la posición 6, también mostró una liberación de histamina muy baja.

Todos los análogos de la tabla 1 pueden sintetizarse mediante el método de la fase sólida utilizando un sintetizador automático (por ejemplo, Beckman modelo 990). Los restos aminoácidos utilizados pueden obtenerse de fuentes comerciales (por ejemplo, Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI), o pueden producirse según métodos conocidos a partir de materiales de partida que pueden obtenerse en el mercado. Por ejemplo, pueden producirse piridinio-N-óxidos mediante la oxidación de la correspondiente piridina con, por ejemplo, peroxiácidos como mCPBA (véase, por ejemplo, el ejemplo 3, a continuación). Los restos piridinio, por ejemplo, los compuestos de N-bencilpiridinio, pueden producirse mediante N-alquilación de la correspondiente piridina, por ejemplo, calentando en un disolvente inerte con bromuro de bencilo (véase los ejemplos 1 y 2 a continuación). De forma similar, las sales sulfónicas y fosfónicas pueden producirse mediante S- o P-alquilación de un sulfuro o fosfina, respectivamente, con una agente alquilante, como por ejemplo yoduro de metilo. Los aminoácidos que no se obtienen en el mercado pueden sintetizarse en forma protegida para el acoplamiento, o si resulta apropiado pueden acoplarse para formar un péptido y posteriormente modificarse para producir la forma deseada.

Ejemplo 2

*Síntesis de la sal hidrobromuro de Boc-D-Pal(Bzl)*

Se suspendió Boc-D-Pal (1,36 g, 6,0 mmol) en 60 ml de acetonitrilo. Se añadió bromuro de bencilo (aproximadamente 50 mmol) y la mezcla se calentó hasta 50ºC en un baño de agua. Se produjo una disolución transparente, y se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. Se formó un precipitado blanco; una TLC después de 17 horas mostró que aún quedaba un poco de material de partida; se continuó la agitación durante un total de 5 días, hasta que la reacción se completó. El disolvente se evaporó bajo presión reducida, y el residuo se recristalizó en EtOH/acetato de etilo. Rendimiento: 85%; p.f. 166-170ºC.

Ejemplo 3

*Síntesis de Boc-D-Pal(iPr)*

Se agitó Boc-D-Pal (4,0 g, 17,7 mmol) y $Ag_2O$ (8,0 g, 34,4 mmol) en 22 ml de agua a temperatura ambiente durante 4 horas. El recipiente de reacción se enfrió hasta 0ºC y se añadió 2-yodopropano (20,4 g, 120 mmol) en 40 ml de 2-propanol. Después de completar la adición, se dejó que la mezcla se calentase hasta la temperatura ambiente y se agitó durante 4 días. Se añadió más $Ag_2O$ (2 g) y 2-yodopropano (2 g) después de 24 horas, y de nuevo después de 48 horas. La mezcla se filtró y el precipitado se lavó con etanol (2 x 15 m). El filtrado se evaporó para producir 4,3 g de un aceite amarillo. La cristalización en etanol/acetato de etilo produjo cristales de color amarillo claro (3,0 g). Rendimiento: 63%; p.f. 182-185ºC.

Ejemplo 4

*Síntesis de Boc-D-Pal(N-O)*

Se disolvió Boc-D-Pal (2,0 g, 7,5 mmol) en 40 ml de acetona y se añadió en una porción 2,48 g (16,5 mmol) de MCPBA (al 57-86%; adquirido en Aldrich y utilizado tal como se recibió) en 80 ml de acetona. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 40 horas; se formó una pequeña cantidad de precipitado blanco a medida que la reacción se desarrollaba. El precipitado se filtró y el licor madre se evaporó para producir un precipitado blanco. Los sólidos reunidos se lavaron con éter (para eliminar el ácido clorobenzoico) y se recristalizaron en acetato de etilo/hexano. Rendimiento: 1,7 g (80%); p.f. 155-157ºC.

Ejemplo 5

*Síntesis peptídica*

Un típico ciclo de acoplamiento para la síntesis peptídica con Boc-aminoácidos en un sintetizador de péptidos (Beckman modelo 990) es como sigue:

Se pesó resina de metilbenzihidramina (MBHA) (1,18 g, 0,85 meq grupos amino/g de resina) en el recipiente de reacción y se lavó con dos porciones de cloroformo (26 ml cada una). La resina se prelavó con tioanisol al 22% (5 ml)/ácido trifluoroacético (TFA) al 66% en 14 ml de diclorometano (DCM) durante 5 minutos, y después se desprotegió durante 30 minutos con la misma mezcla de tioanisol/TFA. La resina se lavó con tres porciones de cloroformo (20 ml cada una), dos porciones de 2-propanol (26 ml cada una) y dos porciones de DCM (26 ml cada una). La resina se neutralizó con dos porciones de diisopropiletilamina (DIPEA) al 12% (26 ml cada una), y después se lavó con cuatro porciones de DCM (26 ml cada una), seguido de dos porciones de DCM:dimetilformamida (DMF) 1:1 (26 ml cada una). Se introdujo una disolución de aminoácido protegido con Boc (2,5 equivalentes molares) y HOBt (2,5 equivalentes molares) como una disolución en 10 ml de DMF, y DCC (256 mg en 6 DMF). Se dejó que el acoplamiento se llevase a cabo durante tres horas, o durante la noche. Los restos impedidos (por ejemplo los aminoácidos de N-metilo del esqueleto) requirieron mayores tiempos de acoplamiento. La resina se lavó con dos porciones de 26 ml de DMF, seguido de dos porciones de 26 ml de 2-propanol, y después con dos porciones de 26 ml de DCM. Se ensayó la finalización del acoplamiento mediante el ensayo de Kaiser (ensayo de ninhidrina). Si el acoplamiento no es completo, se lleva a cabo un acoplamiento doble (es decir, la resina se neutraliza como antes y se repite la etapa de acoplamiento). Cuando se logra el acoplamiento completo, el ciclo se repite con el siguiente aminoácido.

Cuando se completa la síntesis, el péptido se escindió de la resina mediante un tratamiento con ácido fluorhídrico (HF) líquido durante 45 minutos a 0ºC. El HF se evaporó y el péptido se trató con ácido acético acuoso y se liofilizó. El péptido bruto entonces se purificó mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) en una columna $C_{18}$, eluyendo con una mezcla de acetonitrilo y TFA al 0,1% en agua. Las fracciones purificadas (homogéneas mediante análisis UV y TLC) se reunieron y se liofilizaron. Se empleó una HPLC analítica para determinar la pureza del producto final; todos los péptidos sintetizados eran al menos 98% puros.

Ejemplo 6

*Supresión de los niveles de testosterona plasmática*

Se estudió la capacidad de un antagonista de LHRH de la descripción para suprimir los niveles de testosterona plasmática en ratas macho adultas. A las ratas se les administró el antagonista de LHRH #3827 (cuya estructura aparece en la tabla 1). En un experimento, se administró una única inyección del antagonista LHRH por vía subcutánea a unas dosis de 300 ó 1000 $\mu$g/kg. Los animales mostraron una disminución rápida y pronunciada de la testosterona plasmática hasta niveles casi indetectables a las 6 horas después de la administración. Los niveles de testosterona volvieron a la normalidad a las 24 horas después de la dosis de 300 $\mu$g/kg, pero no hasta las 72 horas después de la dosis de 1000 $\mu$g/kg.

En otro experimento, el antagonista de LHRH #3827 se administró en ocho dosis intravenosas de 1, 10 ó 100 $\mu$/kg, cada tres horas, que se corresponden respectivamente con 8, 80 ó 800 $\mu$g/kg/día. Los resultados aparecen en forma de gráfica en la figura 1. Se alcanzaron los niveles de castración de testosterona a la dosis de 10 $\mu$g/kg cada tres horas. Una dosis tan baja como 1 $\mu$g/kg, equivalente a 8 $\mu$g/kg/día, indujo una disminución significativa en los niveles de testosterona plasmática a lo largo de todo el periodo experimental.

En otro experimento, se logró una infusión subcutánea continua del antagonista de LHRH #3827 mediante el uso de una bomba osmótica. Se administraron dosis de 300 ó 1000 $\mu$g/kg/día ("dosis alta") por vía subcutánea durante dos semanas mediante minibombas osmóticas Alzet en cada uno de los cinco machos de rata Sprague-Dawley. Los animales que recibieron 1000 $\mu$g/kg/día se mantuvieron durante dos semanas más con 5, 15 ó 50 $\mu$g/kg/día ("dosis baja") antes de retirar completamente las bombas. Los resultados aparecen en forma gráfica en la figura 2. El tratamiento crónico de las ratas con el antagonista de LHRH con unas dosis iniciales de 300 ó 1000 $\mu$g/kg/día produjo unos niveles de castración de testosterona en los primeros 7 días (y presumiblemente en las primeras 24 horas) con cualquiera de las dosis iniciales, y se mantuvo mediante las tres dosis siguientes durante 21 días más. La castración se mantuvo en todo este periodo sin ninguna "respuesta de castración" aparente, como las que han sido descritas con otros inhibidores. Cuando las bombas de dosis alta se sustituyeron por las bombas de dosis baja de mantenimiento, que administran dosis tan bajas como 5 $\mu$g/kg/día, los animales permanecieron totalmente castrados a lo largo del experimento. Después de finalizar el tratamiento con el antagonista de LHRH, se observó una recuperación dependiente de la dosis de la testosterona plasmática; los animales que recibieron la dosis de mantenimiento mayor parecían recuperarse con más lentitud que los animales tratados con la dosis de mantenimiento menor. La recuperación de los niveles de testosterona después de la retirada de las bombas se completó en dos semanas. En un estudio de seguimiento, cuyos resultados aparecen en forma de gráfica en la figura 3, se logró la supresión completa de la testosterona hasta niveles de castración con dosis tan bajas como 30 $\mu$g/kg/día. Los niveles de castración de nuevo se mantuvieron con una dosis de antagonista de LHRH tan baja como 5 $\mu$g/kg/día.

## REIVINDICACIONES

1. Un antagonista de LHRH, donde dicho antagonista es un compuesto polipeptídico que consiste en 8 a 12 restos aminoacídicos y está diseñado en base a la estructura de LHRH natural de mamífero, donde un resto aminoacídico correspondiente a la posición 4 de LHRH natural de mamífero es serina, un resto aminoacídico correspondiente a la posición 6 de LHRH natural de mamífero es D-asparagina, o L-glutamina, un resto aminoacídico correspondiente a la posición 9 de LHRH natural de mamífero es prolina; y un resto aminoacídico correspondiente a la posición 10 de LHRH natural de mamífero es D-alanina, de forma que el compuesto polipeptídico tiene actividad antagonista de LHRH, o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

2. El antagonista de LHRH de la reivindicación 1, donde dicho antagonista de LHRH es un decapéptido.

3. El antagonista de LHRH de la reivindicación 1, donde dicho antagonista de LHRH es un nonapéptido.

4. El antagonista de LHRH de la reivindicación 1, donde dicho antagonista de LHRH es un octapéptido.

5. El antagonista de LHRH de la reivindicación 1, que inhibe la ovulación en al menos 50% de las ratas tratadas en un ensayo anti-ovulatorio convencional con ratas a una dosis de 5 $\mu$g/rata y tiene una $ED_{50}$ para la liberación de histamina de al menos 3 $\mu$g/ml.

6. El antagonista de LHRH de la reivindicación 5, que inhibe la ovulación en al menos 50% de las ratas tratadas en un ensayo anti-ovulatorio convencional con ratas a una dosis de 2 $\mu$g/rata.

7. El antagonista de LHRH de la reivindicación 1, que inhibe la ovulación en al menos 50% de las ratas tratadas en un ensayo anti-ovulatorio convencional con ratas a una dosis de 1 $\mu$g/rata.

8. El antagonista de LHRH de la reivindicación 5, que tiene una $ED_{50}$ para la liberación de histamina de al menos 5 $\mu$g/ml.

9. El antagonista de LHRH de la reivindicación 5, que tiene una $ED_{50}$ para la liberación de histamina de al menos 10 $\mu$g/ml.

10. El antagonista de LHRH de la reivindicación 1, donde el compuesto polipeptídico comprende una estructura:

A-B-C-D-E-F-G-H-I-J

donde

A es piro-Glu, Ac-D-Nal, Ac-D-Qal, Ac-Sar o Ac-D-Pal;

B es His o 4-Cl-D-Phe;

C es Trp, D-Pal, D-Nal, L-Nal-D-Pal(N-O) o D-Trp;

D es Ser;

E es N-Me-Ala, Tyr, N-Me-Tyr, Ser, Lys(iPr), 4-Cl-Phe, His, Asn, Met, Ala, Arg o Ile;

F es D/L-Asn o D-Gln;

G es Leu o Trp;

H es Lys(iPr), Gln, Met o Arg;

I es Pro; y

J es D-Ala-$NH_2$;

o su sal farmacéuticamente aceptable.

11. Un antagonista de LHRH que comprende una estructura seleccionada del grupo que consiste en:

Ac-D-Nal1, 4-Cl-D-Phe2, D-Pal3, D-Asn6-Lys(iPr)8, D-Ala10-LHRH

y su sal farmacéuticamente aceptable.

12. Una composición farmacéutica que comprende un antagonista de LHRH de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o su sal farmacéuticamente aceptable y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

13. Uso de un antagonista de LHRH de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o su sal farmacéuticamente aceptable para la fabricación de un medicamento para inhibir la actividad de LHRH en un individuo.

14. Uso de un antagonista de LHRH de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o su sal farmacéuticamente aceptable para la fabricación de un medicamento para inhibir el crecimiento de un tumor dependiente de hormonas en un individuo.

15. Uso de la reivindicación 14, donde dicho tumor dependiente de hormonas es cáncer de próstata.

16. Uso de un antagonista de LHRH de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o su sal farmacéuticamente aceptable para la fabricación de un medicamento para inhibir la ovulación en un individuo.

17. Una formulación empaquetada para tratar un individuo con un trastorno asociado a la actividad de LHRH, que comprende el antagonista de LHRH de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o su sal farmacéuticamente aceptable empaquetados con instrucciones para usar el antagonista de LHRH para tratar un individuo que tiene un trastorno asociado a la actividad de LHRH.

18. La formulación empaquetada de la reivindicación 17, donde dicho trastorno es endometriosis.

19. Una composición farmacéutica que comprende el antagonista de LHRH de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o su sal farmacéuticamente aceptable y un vehículo farmacéuticamente aceptable; y

(a) que comprende un polímero de liberación lenta; o

(b) que es adecuado para inyección depot.

20. Uso de un antagonista de LHRH de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o su sal farmacéuticamente aceptable para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en pubertad precoz, cáncer de próstata, cáncer de ovario, hipertrofia prostática benigna, endometriosis, fibroides uterinos, cáncer de mama, síndrome premenstrual, síndrome de ovario poliquístico, y enfermedades que se producen por un exceso de hormonas gonadales.

21. El antagonista de LHRH de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o su sal farmacéuticamente aceptable para uso en terapia, opcionalmente el tratamiento de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en pubertad precoz, cáncer de próstata, cáncer de ovario, hipertrofia prostática benigna, endometriosis, fibroides uterinos, cáncer de mama, síndrome premenstrual, síndrome de ovario poliquístico, y enfermedades que se producen por un exceso de hormonas gonadales.

22. Uso de un antagonista de LHRH de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o su sal farmacéuticamente aceptable para la fabricación de un medicamento para controlar la reproducción.

23. Uso de un antagonista de LHRH de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o su sal farmacéuticamente aceptable para controlar la reproducción en machos o hembras, que excluye métodos para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.

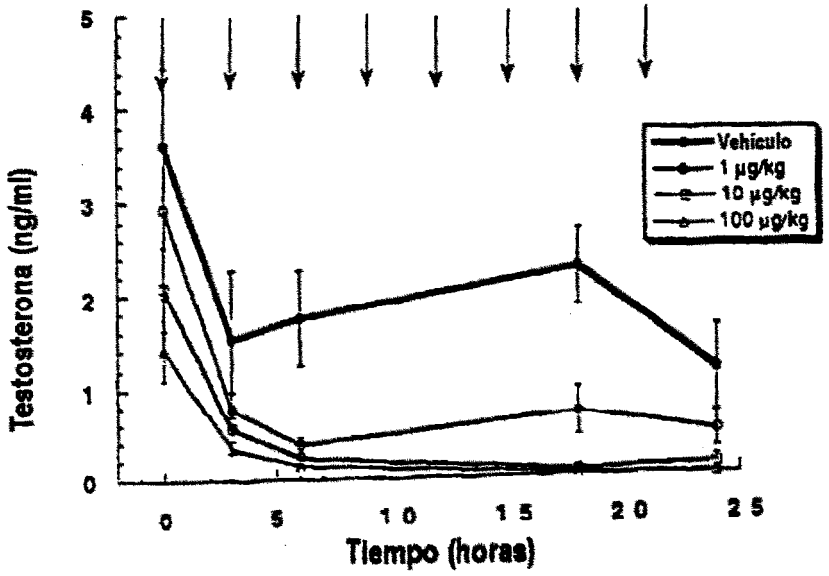

Testosterona (ng/ml)
Tiempo (horas)
Vehiculo
1 µg/kg
10 µg/kg
100 µg/kg
0
1
2
3
4
5
0
5
10
15
20
25

FIGURA 1

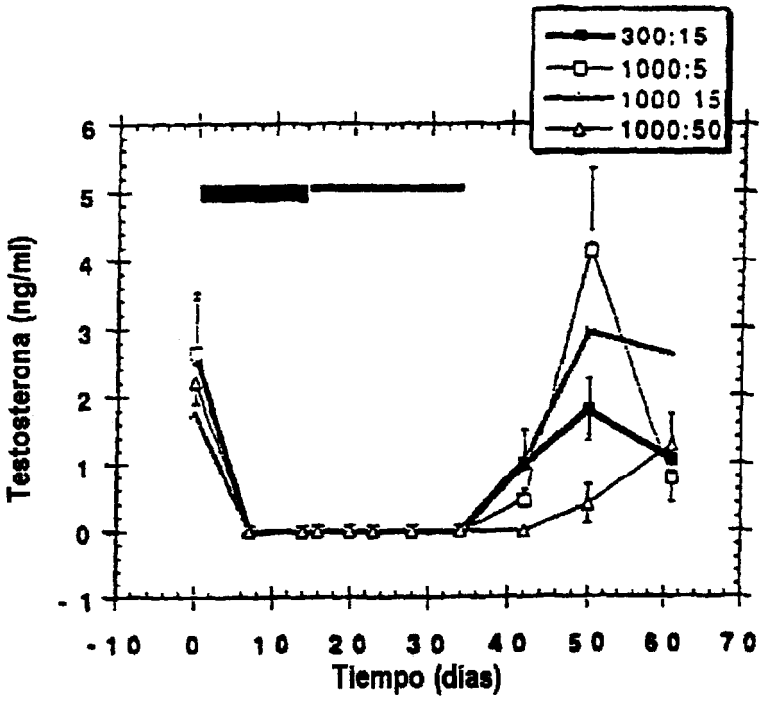

300:15
1000:5
1000 15
1000:50
Testosterona (ng/ml)
6
5
4
3
2
1
0
- 1
-10
0
10
20
30
40
50
60
70
Tiempo (días)

FIGURA 2

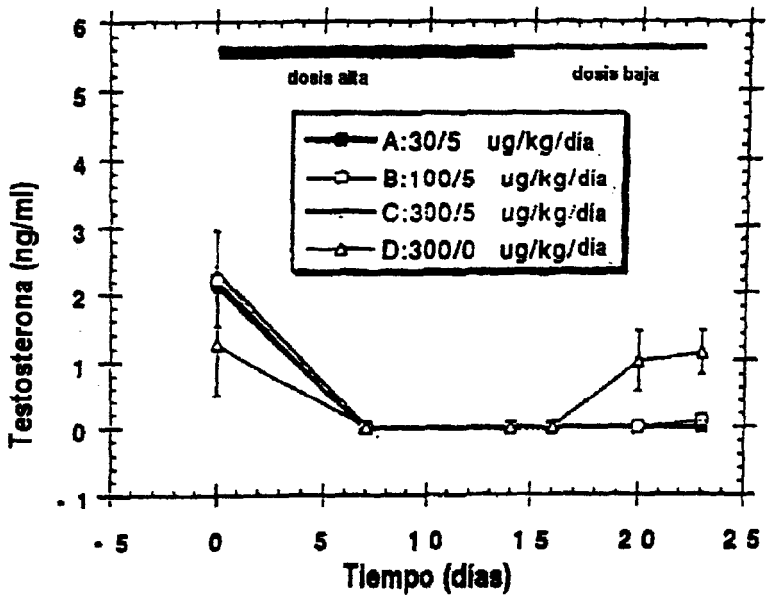

dosis alta
dosis baja
A:30/5 ug/kg/dia
B:100/5 ug/kg/dia
C:300/5 ug/kg/dia
D:300/0 ug/kg/dia
Testosterona (ng/ml)
6
5
4
3
2
1
0
-1
-5
0
5
10
15
20
25
Tiempo (días)

FIGURA 3

**LISTA DE SECUENCIAS**

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

(i) SOLICITANTE:

(A) NOMBRE: INDIANA UNIVERSITY FOUNDATION

(B) CALLE: ONE CITY CENTER, SUITE 314

(C) CIUDAD: BLOOMINGTON

(D) ESTADO: INDIANA

(E) PAÍS: EEUU

(F) CÓDIGO POSTAL: 47401

(ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: Péptidos antagonistas de LHRH

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 1

(iv) DIRECCIÓN PARA LA CORRESPONDENCIA:

(A) DESTINATARIO: LAHIVE & COCKFIELD

(B) CALLE: 60 State Street, Suite 510

(C) CIUDAD: Boston

(D) ESTADO: Massachusetts

(E) PAÍS: EEUU

(F) CÓDIGO POSTAL: 02109-1875

(v) FORMA DE LECTURA POR ORDENADOR:

(A) TIPO MEDIO: disquete

(B) ORDENADOR: IBM PC compatible

(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS

(D) PROGRAMA: PatentIn Release nº 1.0, versión nº 1.25

(vi) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:

(A) NÚMERO DE SOLICITUD: 000000

(B) FECHA DE PRESENTACIÓN: con la presente

(C) CLASIFICACIÓN:

(vii) DATOS DE LA SOLICITUD ANTERIOR:

(A) NÚMERO DE SOLICITUD: USSN 08/480.494

(B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 7 de junio de 1995

(viii) INFORMACIÓN DEL ABOGADO/AGENTE:

(A) NOMBRE: DeConti, Giulio A.

(B) NÚMERO DE REGISTRO: 31.503

(C) NÚMERO DE REFERENCIA/REGISTRO: PPI-007CPPC

(ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIONES:

(A) TELÉFONO: (617)227-7400

(B) TELEFAX: (617)227-5941

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 10 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácidos

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:1:

```
Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
1               5                   10
```