



Le Ministre des Affaires Économiques,

Vu la loi du 24 mai 1854 sur les brevets d'invention ;

Vu la Convention d'Union pour la Protection de la Propriété Industrielle ;

Vu le procès-verbal dressé le 25 juin 1981 à 15 h. 20

au Service de la Propriété Industrielle ;

ARRÊTE :

Article 1. — Il est délivré à la Sté dite : THE SALK INSTITUTE FOR BIOLOGICAL STUDIES

10010 North Torrey Pines Road, La Jolla, California
(Etats-Unis d'Amérique)

repr. par le Bureau Gevers S.A. à Bruxelles.

un brevet d'invention pour : Procédé inhibant la libération des gonadotropines

qu'elle déclare avoir fait l'objet d'une demande de brevet déposée aux Etats-Unis d'Amérique le 26 juin 1980, n° PCT/US80/00818 au nom de C.L. Rivière, J.E.F. Rivière et W.W. Vale, jr. dont elle est l'ayant cause.

Article 2. — Ce brevet lui est délivré sans examen préalable, à ses risques et périls, sans garantie soit de la réalité, de la nouveauté ou du mérite de l'invention, soit de l'exactitude de la description, et sans préjudice du droit des tiers.

Au présent arrêté demeurera joint un des doubles de la spécification de l'invention (mémoire descriptif et éventuellement dessins) signés par l'intéressé et déposés à l'appui de sa demande de brevet.

Bruxelles, le 15 juillet 1981.

PAR DÉLÉGATION SPÉCIALE :

Le Directeur

L. SALPETEUR

MEMOIRE DESCRIPTIF

déposé à l'appui d'une demande de

BREVET D'INVENTION

au nom de:

THE SALK INSTITUTE FOR BIOLOGICAL STUDIES

pour:

"Procédé inhibant la libération des gonadotropines"

Priorité d'une demande de brevet PCT déposée aux Etats-Unis
d'Amérique le 26 juin 1980, sous le N° PCT/US80/00818.

*au nom
de Catherine Louise RIVIER, Jean Edouard Frédéric RIVIER.
et Wylie Walker VALE, Jr.*

6

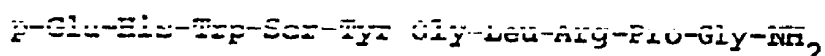
La présente invention est relative à des peptides qui inhibent la libération de gonadotropines par la glande pituitaire ou hypophyse chez les mammifères, y compris chez les êtres humains, et elle se rapporte d'une manière plus spécifique à des méthodes pour empêcher la conception par l'administration à des mammifères mâles de tels peptides qui inhibent la fonction des gonades et la libération des hormones stéroïdiques, la progestérone et la testostérone.

La glande pituitaire ou hypophyse est fixée par un pédoncule à la région se trouvant à la base du cerveau connue sous le nom d'hypothalamus. La glande pituitaire comprend deux lobes, les lobes antérieur et postérieur. Le lobe antérieur de la glande pituitaire accumule et fait passer dans la circulation générale deux hormones fabriquées dans l'hypothalamus, ces hormones étant la vasopressine et l'oxytocine. Le lobe antérieur de la glande pituitaire secrète un certain nombre d'hormones, qui sont des molécules protéiques ou glycoprotéiques complexes qui se déplacent à travers la circulation sanguine vers différents organes et qui, à leur tour, stimulent la sécrétion dans la circulation sanguine d'autres hormones provenant des organes périphériques. En particulier, l'hormone folliculostimulante (FSH) et l'hormone lutéinisante (LH), quelque fois appelées gonadotropines ou hormones gonadotropiques, sont libérées par la glande pituitaire. Ces hormones, en combinaison, règlent le fonctionnement des gonades pour la production de testostérone dans les testicules et de progestérone et d'oestrogène dans les ovaires, et règlent également la production et la maturation des gamètes.

La libération d'une hormone par le lobe antérieur de la

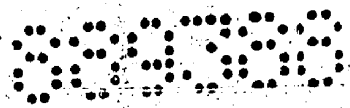
d

glande pituitaire ou hypophyse requiert ordinairement une libération préalable d'une autre classe d'hormones produites par l'hypothalamus. L'une de ces hormones hypothalamiques agit comme facteur qui déclenche la libération des hormones gonadotropiques, en particulier la LH. L'hormone hypothalamique qui agit comme facteur de libération pour la LH, est appelée dans le cadre de la présente invention LRF, bien qu'on puisse également l'appeler LH-RH et GnRH. Le LRF a été isolé et caractérisé comme étant un décapeptide répondant à la structure suivante:



Les peptides sont des composés qui contiennent deux ou plusieurs aminoacides dans lesquels le groupe carboxyle d'un acide est lié au groupe amino de l'autre acide. La formule pour le LRF, telle que représentée ci-dessus, concorde avec la représentation traditionnelle des peptides où le groupe amino paraît à la gauche et le groupe carboxyle à la droite. La position du résidu d'acide est identifiée en numérotant les résidus d'acide de la gauche vers la droite. Dans le cas du LRF, la portion hydroxyle du groupe carboxyle de la glycine a été remplacée par un groupe amino (NH_2). Les abréviations pour les résidus d'acide individuels susmentionnés sont des abréviations que l'on utilise ordinairement et sont basées sur la dénomination habituelle de l'acide; c'est-à-dire que p-Glu représente l'acide pyroglutamique, His représente l'histidine, Trp représente le tryptophane, Ser représente la sérine, Tyr représente la tyrosine, Gly représente la glycine, Leu représente la leucine, Arg représente l'arginine, et Pro représente la proline. A l'exception de la glycine, les aminoacides des peptides de l'invention sont de la configuration

C

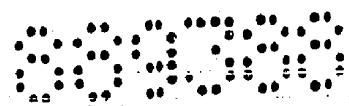


L, sauf indications contraires.

Il est connu que la substitution de D-aminoacides au Gly en position 6 du décapeptide LRF, peut donner un peptide ayant une puissance d'environ 1 à 35 fois plus grande, par rapport au LRF, pour effectuer la libération de la LH et d'autres gonadotropines par la glande pituitaire des mammifères. L'effet de libération est obtenu lorsque l'analogue de LRF, appelé agoniste de LRF, est introduit dans la circulation sanguine d'un mammifère.

Il est également connu que la substitution de différents aminoacides au His (ou la destruction de His) en position 2 du décapeptide LRF peut produire des analogues, appelés antagonistes de LRF, ayant un effet inhibiteur sur la libération de la LH et d'autres gonadotropines par la glande pituitaire des mammifères. En particulier, on obtient différents degrés d'inhibition de la libération de la LH lorsque His est détruit (des His) ou remplacé par D-Ala, D-Phe ou Gly. L'effet inhibiteur de ces peptides modifiés en position 2 peut être encore accru lorsque l'on substitue un D-aminoacide au Gly en position 6 des décapeptides. Par exemple, le peptide: [des His², D-Ala⁶] LRF, c'est-à-dire pGlu-Trp-Ser-Tyr-D-Ala-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂, est trois fois plus puissant comme inhibiteur pour la libération de gonadotropines que ne l'est le même peptide où Gly est présent en position 6 plutôt que D-Ala.

Certains mammifères femelles qui n'ont pas de cycle ovulatoire et qui ne présentent pas de troubles hypophysaires ou ovariens commencent à sécréter des quantités normales de gonadotropines LH et FSH après l'administration appropriée de LRF. C'est ainsi que l'administration de LRF est considérée comme appropriée pour le traitement des cas de stérilité où un trouble fonc-

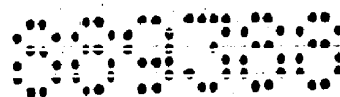


tionnel réside dans l'hypothalamus. Il y a également des raisons pour lesquelles on désire empêcher l'ovulation chez les mammifères femelles, et l'administration d'antagonistes de LRF a été utilisée pour empêcher l'ovulation. On a également constaté que l'administration d'agonistes puissants s'est révélée intéressante en diminuant sensiblement le nombre de spermatozoïdes chez les mammifères mâles; toutefois, des méthodes plus efficaces permettant d'inhiber la spermatogenèse chez les mammifères mâles utilisant des analogues de LRF sont recherchées.

La présente invention prévoit un procédé de traitement des mammifères mâles, y compris les êtres humains, utilisant des peptides qui inhibent fortement la libération des gonadotropines. L'administration de ces analogues de LRF qui sont de puissants antagonistes de LRF ont un effet inhibiteur sur les processus de reproduction des mammifères mâles et réalise une diminution tellement importante de la numérotation ou du nombre de spermatozoïdes que la fertilisation est empêchée d'une manière efficace.

D'une manière générale, suivant la présente invention, on a constaté que l'administration répétée d'antagonistes de LRF qui inhibent fortement la sécrétion des gonadotropines par la glande pituitaire ou hypophyse des mammifères, y compris les êtres humains, et qui inhibent la libération des stéroïdes par les gonades, peut être appliquée chez les mammifères mâles car ces antagonistes de LRF s'avèrent efficaces à des niveaux de dosage suffisamment faibles, c'est-à-dire ne dépassant pas environ 3 mg par jour par kilo de poids de corps, pour éliminer les effets dermatologiques et autres effets secondaires indésirables. Le peptide a de préférence une affinité de liaison d'au moins quinze fois celle montrée par le LRF. Le peptide doit avoir une valeur de





ICR₅₀ inférieure à 1/1. et peut être administrée par une méthode appropriée et convenable quelconque, par exemple par la voie orale, par injection ou par voie sous-cutanée. L'administration orale est préférable pour les êtres humains; toutefois, l'injection peut s'avérer préférable pour les utilisations en médecine vétérinaire. Le peptide peut être combiné à des supports ou diluants pharmaceutiquement acceptables appropriés, tels que les huiles végétales, des sucres, de l'amidon de maïs, des polysaccharides et des gommes. Le peptide pourrait être administré chaque jour pendant sept jours consécutifs de chaque mois. Ou bien, il pourrait être administré chaque jour à un taux quelque peu inférieur en même temps que des androgènes appropriés.

Ces peptides sont souvent administrés sous la forme de sels non toxiques pharmaceutiquement acceptables, tels que des sels d'addition d'acide ou des complexes métalliques, par exemple avec du zinc, du fer, etc (qui sont considérés comme sels d'addition dans le cadre de la présente invention). Des exemples de ces sels d'addition d'acide sont les chlorhydrate, bromhydrate, sulfate, phosphate, maléate, acétate, citrate, benzoate, succinate, malate, ascorbate, tartrate etc.

Des exemples de peptides que l'on peut utiliser sont les antagonistes de LRF dans lesquels il y a des substitutions en positions 1 et 6, dans lesquels du D-Phe substitué est présent en position 2 et dans lesquels du D-Trp est présent en position 3. La position 1 peut contenir du déshydro-Pro, du déshydro-D-Pro, du Thz ou du D-Thz. La position 6 peut contenir soit du D-Trp soit du (imBzl)D-His. De plus, certaines substitutions peuvent éventuellement être faites en positions 7 et 10. Par déshydro Pro,

c

7

on entend la 3,4-déshydroproline, c'est-à-dire $C_4H_3O_2N$, et lorsque R_1 représente un radical acyle, il est fixé à l'azote. Thz signifie l'acide méta-thiazolidine-2-carboxylique, $C_4H_7O_2NS$, que l'on peut préparer par le traitement de chlorhydrate de cystéine avec du formaldéhyde. Lorsque R_1 représente un radical acyle, il est fixé à l'azote; par exemple, on prépare Ac-Thz par la réaction de Thz avec de l'anhydride acétique.

D'une manière plus spécifique, les peptides de la présente invention sont représentés par la formule suivante:

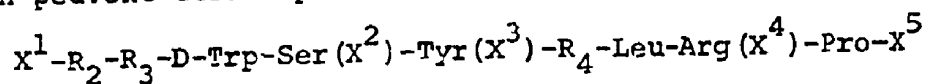
$R_1-R_2-R_3-D-Trp-Ser-Tyr-R_4-Leu-Arg-Pro-Gly-NH_2$,
dans laquelle R_1 représente de l'hydrogène ou un radical formyle, acétyle, acrylyle, benzoyle ou allyle, R_2 représente du déshydro Pro, du déshydro D-Pro, du Thz ou du D-Thz, R_3 représente pCl-D-Phe, pF-D-Phe, pNO₂-D-Phe ou 3,4 Cl-D-Phe; R_4 représente D-Trp ou (imBzl)D-His. En plus, Leu peut être substitué par N^αMeLeu. et Gly-NH₂ peut être substitué par NHCH₂CH₃ ou par n'importe quel autre alkyl amide comportant 1 à 5 atomes de carbone. On peut utiliser d'autres groupes acyle équivalents pour R_1 .

Les peptides de la présente invention peuvent être synthétisés par une technique en phase solide en utilisant une résine chlorométhylée pour les peptides dans lesquels un alkylamide est présent et une résine de benzhydrylamine (BHA) pour les peptides dans lesquels Gly-NH₂ est présent. La synthèse est réalisée en ajoutant par paliers successifs les aminoacides dans la chaîne de la manière expliquée en détail dans le brevet des Etats-Unis d'Amérique n° 4.072.668, incorporé dans le cadre de la présente invention à titre de référence. Les groupes de protection des chaînes latérales, ainsi que cela est bien connu en pratique, sont ajoutés à Ser, Tyr, Arg et His avant que ces aminoacides ne soient

d

couplés à la chaîne en formation sous la résine.

Une telle méthode permet d'obtenir la peptidorésine intermédiaire totalement protégée. Le peptide totalement protégé peut être clivé à partir du support de résine par aminolyse, ainsi que cela est bien connu en pratique, pour donner l'intermédiaire d'amide totalement protégé. Les intermédiaires de l'invention peuvent être représentés par la formule suivante:



dans laquelle X^1 représente un groupe de protection d' α -amino du type que l'on utilise en pratique dans la synthèse par paires successifs des polypeptides, et lorsque R_1 dans la composition de peptide désirée représente un groupe acyle particulier, ce groupe pouvant être utilisé comme groupe de protection. Parmi les classes de groupes de protection d' α -aminocouvertes par X^1 , on citera (1) les groupes de protection du type acyle, tels que les groupes formyle, trifluoroacétyl, phtalyle, Tos, benzoyle, benzènesulfonyl, nitrophénylsulfényl, tritylsulfényl, o-nitrophénoxyacétyl, acrylyl, chloroacétyl, acétyl et α -chlorobutyryl; (2) les groupes de protection du type uréthane aromatique, par exemple le benzyloxycarbonyl et les benzyloxycarbonyls substitués, tels que le p-chloro-benzyloxycarbonyl, le p-nitrobenzyloxycarbonyl, le p-bromobenzyloxycarbonyl et le p-méthoxybenzyloxycarbonyl; (3) les groupes de protection du type uréthane aliphatique, tels que le tertiobutyloxycarbonyl (Boc), le diisopropylméthoxycarbonyl, l'isopropylloxycarbonyl, l'éthoxycarbonyl et l'allyloxycarbonyl; (4) les groupes de protection du type uréthane cycloalkylé, tels que le cyclopentylloxycarbonyl, l'adamantylloxycarbonyl et le cyclohexylloxycarbonyl; (5) les groupes de protection du type thiouréthane, tels que le phénylthiocarbonyl; (6) les groupes de

protection du type alkyle, tels que l'allyle, le triphénylméthyl (trityle) et le benzyle; (7) les groupes de trialkylsilane, tels que le triméthylsilane. Le groupe de protection d' α -amino préféré est le Boc lorsque R_1 représente de l'hydrogène.

X^2 est un groupe de protection pour le groupe hydroxyle alcoolique de Ser et est choisi parmi l'acétyle, le benzoyle, le tétrahydropyrannyle, le tert-butyle, le trityle, le benzyle et le 2,6-dichlorobenzyle. Le benzyle est préféré.

X^3 représente un groupe de protection pour le groupe hydroxyle phénolique de Tyr et est choisi dans le groupe comprenant le tétrahydropyrannyle, le tert-butyle, le trityle, le benzyle, le benzyloxycarbonyle, le 4-bromobenzyloxycarbonyle et le 2,6-dichlorobenzyle. Le 2,6-dichlorobenzyle est préféré.

X^4 représente un groupe de protection pour le groupe guanidino de Arg et est choisi dans le groupe comprenant les radicaux nitro, Tos, benzyloxycarbonyle, adamantyloxycarbonyle, et Boc; ou bien, X^4 peut représenter de l'hydrogène, ce qui signifie qu'il n'y a pas de groupes de protection sur les atomes d'azote des chaînes latérales de l'arginine.

X^5 est choisi parmi la diméthylamine, les alkylamines de 1 à 5 atomes de carbone, la phénéthylamine, $O-CH_2$ - (support de résine), $Gly-O-CH_2$ - (support de résine) et $Gly-NH$ - (support de résine).

Les critères pour choisir les groupes de protection de chaînes latérales en ce qui concerne X^2-X^4 résident dans le fait que le groupe de protection doit être stable vis-à-vis du réactif sous les conditions réactionnelles choisies pour séparer le groupe de protection d' α -amino à chaque étape de la synthèse, que le groupe de protection ne doit pas être éliminé sous des conditions de



couplage et que le groupe de protection puisse être enlevé à la fin de la synthèse de la séquence d'acides aminés désirée sous des conditions de réaction qui ne modifient pas la chaîne de peptide.

Lorsque le groupe X^5 représente $-O-CH_2-$ [support de résine] ou $Gly-O-CH_2-$ [support de résine], le fragment d'ester d'un des nombreux groupes fonctionnels du support de résine de polystyrène est représenté. Lorsque le groupe X^5 représente $Gly-NH-$ [support de résine], une liaison d'amide relie Gly à la résine de BHA ou à une résine de BHA paraméthylée.

Lorsque R_1 représente un radical acétyle, formyle, acrylyle, benzoyle ou allyle, il peut être utilisé comme groupe de protection X^1 pour le groupe α -amino de la proline ou de Thz, auquel cas il peut être ajouté à la proline ou au Thz avant d'être couplé à la chaîne de peptide. Acétyle est abrégé en Ac, et acrylyle est abrégé en Acr. Ou bien, on peut réaliser une réaction avec le peptide sur la résine, par exemple par réaction avec de l'acide acétique en présence de dicyclohexyl carbodiimide (DCC) ou avec de l'anhydride acétique.

La séparation de la protection des peptides ainsi que le clivage du peptide à partir de la résine de benzhydrylamine se font à 0°C avec de l'acide fluorhydrique (HF). On ajoute de l'anisole au peptide avant le traitement avec le HF. Après la séparation du HF, sous vide, on traite le peptide dont la protection a été séparée, on le clive avec de l'éther, on le décante, on le reprend dans de l'acide acétique dilué et on le lyophilise. La purification du peptide est effectuée par une chromatographie échangeuse d'ions sur une colonne CMC, suivie d'une chromatographie de partage en utilisant le système d'élution suivant: n-butanol et acide acétique 0,1N (rapport en volume: 1/1), sur une

b

colonne garnie de Séphadex G 25.

Les peptides de l'invention sont considérés comme étant efficaces à des taux de 200 microgrammes par kg de poids de corps. Il est préférable d'utiliser des niveaux de dosage d'environ 0,1 à environ 3 mg par kg de poids de corps lorsque les antagonistes sont administrés pour inhiber la spermatogenèse chez les mammifères mâles sur une base régulière; toutefois, il n'est pas certain que le poids corporel est le véritable critère, de sorte que des quantités moindres peuvent s'avérer efficaces.

Les exemples suivants illustrent plus en détail différentes caractéristiques de l'invention mais ne constituent en aucun cas une limitation à celle-ci.

Exemple 1

A titre d'exemple, une synthèse en phase solide caractéristique de [Ac-déhydro Pro¹, pCl-D-Phe², D-Trp^{3,6}, N^α MeLeu⁷]-LRF est donnée ci-après. Ce peptide répond à la formule suivante:

Ac-déshydro Pro-pCl-D-Phe-D-Trp-Ser-Tyr-D-Trp-N^α MeLeu-Arg-Pro-Gly-NH₂.

On utilise une résine de BHA, et du Gly protégé par Boc est couplé à la résine sur une période de 2 heures dans du CH₂Cl₂, en utilisant un excès de trois fois de dérivé de Boc et du DCC comme réactif d'activation. Le résidu de glycine se fixe au résidu de BHA par une liaison d'amide.

Après le couplage de chaque résidu d'acide aminé, le lavage, le déblocage et le couplage du résidu d'acide aminé suivant sont réalisés conformément à l'échelle ci-après en utilisant une machine automatisée et en commençant avec environ 5 g de résine :

de

Etape	Réactifs et opérations	Temps de mélange, min.
1	Lavage au CH_2Cl_2 - 80 ml (2 fois)	3
2	Lavage au méthanol (MeOH) - 30 ml (2 fois)	3
3	Lavage au CH_2Cl_2 - 80 ml (3 fois)	3
4	50% de TFA plus 5% de 1,2-éthanedithiol dans CH_2Cl_2 - 70 ml (2 fois)	10
5	Lavage au CH_2Cl_2 - 80 ml (2 fois)	3
6	12,5% de TEA dans CH_2Cl_2 - 70 ml (2 fois)	5
7	Lavage au MeOH - 40 ml (2 fois)	2
8	Lavage au CH_2Cl_2 - 80 ml (3 fois)	3
9	Boc-aminoacide (10 mmoles) dans 30 ml de DMF ou de CH_2Cl_2 , suivant la solubilité de l'aminoacide protégé particulier, (1 fois) plus DCC (10 mmoles) dans CH_2Cl_2	30-300
10	Lavage au MeOH - 40 ml (2 fois)	3
11	12,5% de TEA dans CH_2Cl_2 - 70 ml (1 fois)	3
12	Lavage au MeOH - 30 ml (2 fois)	3
13	Lavage au CH_2Cl_2 - 80 ml (2 fois)	3

Après l'étape 13, on prélève une portion pour un essai à la ninhydrine : si l'essai est négatif, on revient à l'étape 1 pour le couplage de l'aminoacide suivant; si l'essai est positif ou légèrement positif, on revient et on répète les étapes 9 à 13.

L'échelle susmentionnée est utilisée pour le couplage de chacun des aminoacides du peptide de l'invention après avoir attaché le premier aminoacide. La protection de N^α Boc est utilisée pour chacun des aminoacides restants tout au long de la synthèse. La chaîne latérale de Arg est protégée avec Tos. On utilise Bzl comme groupe de protection de chaîne latérale pour le groupe hydroxyle de Ser, et on utilise le 2,6-dichlorobenzyle comme groupe de protection de chaîne latérale pour le groupe hydroxyle de Tyr.

On introduit du N-acétyl-glycyl-L-hydroxyproline comme aminoacide final. Du Boc-Arg (Tos) et du Boc-D-Trp, qui ont une faible solubilité dans CH_2Cl_2 , sont couplés en utilisant du DMF.

Le clivage du peptide à partir de la résine et la séparation totale de la protection des chaînes latérales se font très aisément à 0°C avec du HF. On ajoute de l'anisole comme épurateur avant le traitement au HF. Après séparation du HF sous vide, on extrait la résine avec de l'acide acétique à 50% en volume, et les lavages après dilution avec H_2O jusqu'à moins de 10% en volume sont lyophilisés pour donner une poudre de peptide brute.

La purification du peptide est ensuite effectuée au moyen d'une chromatographie échangeuse d'ions sur CMC (Whatman CM avec l'utilisation d'un gradient de NH_4OAc 0,12 M dans du méthanol eau 50/50) suivie d'une chromatographie de partage dans une colonne de filtration pour gel en utilisant le système d'élution suivant: n-butanol et acide acétique 0,1N (rapport en volume: 1/1).

On essaye le peptide in vitro en utilisant des cellules pituitaires ou hypophysaires de rat dissociées maintenues en culture pendant 4 jours avant l'essai. Les niveaux de LH obtenus en réponse à l'application de peptides sont testés par une technique de radioimmunoessai spécifique pour la LH de rat. Des récipients plats de cellules ne reçoivent que du LRF (3 nanomolaire). Des récipients plats expérimentaux reçoivent une mesure 3 nanomolaire dans du LRF plus une mesure ayant une concentration de peptide d'essai allant de 1 à 100 nanomolaire. La quantité de LH sécrétée dans les échantillons traités seulement avec du LRF est comparée à celle sécrétée par les échantillons traités avec le peptide plus le LRF de manière à déterminer le rapport auquel une

d

14

SECRET

quantité de l'antagoniste inhibe l'activité d'une certaine quantité de LRF. Les résultats sont calculés et exprimés sous la forme du rapport de concentrations molaires du peptide d'essai au LRF (antagoniste/LRF) requis pour réduire la quantité de LH libérée par du LRF 3 nanomolaire jusqu'à 50% de la valeur de référence (ICR_{50}). Pour que le peptide soit considéré comme étant efficace dans le procédé de la présente invention, il doit avoir une valeur de ICR_{50} inférieure à 1/1. Le peptide de l'exemple 1 a une valeur de ICR_{50} de 0,043/1 et une affinité de liaison d'environ 25 fois celle du LRF.

On utilise le peptide à un niveau efficace pour réduire le poids des testicules et des vésicules séminales et également pour inhiber la spermatogenèse après une administration de 14 jours à des rats mâles. Les niveaux de testostérone (T) des rats mâles traités par l'antagoniste sont comparables à ceux des animaux témoins une semaine après l'arrêt du traitement pendant 14 jours. Les poids des prostates des rats mâles se retrouvent après 2-3 semaines et les poids des vésicules séminales se retrouvent après 4-5 semaines. Il est préférable d'utiliser des niveaux de dosage dans la gamme d'environ 0,1 à environ 1 mg par rat par jour, qui peuvent s'administrer sans effets secondaires défavorables. Il est possible d'utiliser des teneurs inférieures en antagonistes pour obtenir des résultats similaires.

Exemple 2

Des rats mâles (environ 320 g chacun) sont chacun traités avec 1 mg du peptide synthétisé dans l'Exemple 1, une fois par jour, pendant 14 jours par injection dans 0,2 ml d'huile de maïs. Tous les rats présentent une diminution de poids des

b

testicules et des vésicules séminales. De plus, les niveaux ou teneurs en gonadotropines immunoréactives, c'est-à-dire la LH, la FSH, la testostérone et la dihydrotestostérone (DHT) chez les animaux mâles traités, sont réduits comparativement aux animaux témoins.

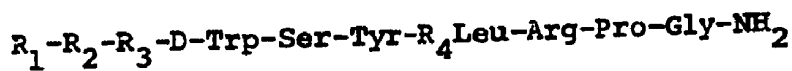
Un examen histologique des testicules après le traitement de 14 jours révèle une spermatogenèse dopée pendant une période allant jusqu'à plusieurs semaines après la cessation des injections journalières. Les rats sont incapables de provoquer une fertilisation après le traitement pendant environ 7 jours consécutifs.

La récupération complète du poids des testicules et des vésicules séminales ainsi que de la spermatogenèse en dernier lieu se produit après la cessation de l'administration de peptide pendant 14 jours. Après environ 4 semaines, les poids des testicules sont égaux à environ 80% de ceux du groupe témoin, et environ 7 jours après, une bonne spermatogenèse apparaît dans la majorité des tubes.

Le peptide essayé s'avère intéressant pour empêcher la reproduction chez les mammifères mâles sans provoquer d'effets secondaires défavorables ou de troubles irréversibles. Pour l'administration aux hommes sur une base régulière, il serait préférable de l'administrer en même temps que des androgènes appropriés.

Exemple 3

D'autres antagonistes de LRF répondant à la formule générale:



sont synthétisés de la façon suivante:

E

Peptide	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
A	Ac	Déshydro Pro	pF-D-Phe	D-Trp
B	Acr	Déshydro Pro	pCl-D-Phe	D-Trp
C	Ac	Déshydro Pro	pCl-D-Phe (imBzl)	D-His
D	Ac	Thz	pCl-D-Phe	D-Trp
E	Ac	Déshydro Pro	pCl-D-Phe	D-Trp

Ces peptides sont également essayés de la même façon que le peptide de l'Exemple 1, et on constate qu'ils ont la valeur de ICR₅₀ donnée ci-après.

Peptide	(ICR ₅₀)
A	0,06/1
B	0,04/1
C	0,10/1
D	0,15/1
E	0,04/1

Ces peptides sont ensuite essayés suivant le procédé de l'Exemple 2, et tous les cinq peptides s'avèrent intéressants comme composés pour inhiber la spermatogenèse et empêcher la reproduction lorsqu'on les administre à des mammifères mâles à un dosage similaire pendant des périodes de temps similaires.

Il doit être entendu que la présente invention n'est en aucune façon limitée aux formes de réalisation ci-avant et que bien des modifications peuvent y être apportées sans sortir du cadre du présent brevet. Par exemple, une substitution et des modifications dans les autres membres de la chaîne de LRF peuvent être effectuées conformément à des développements bien connus qui ont permis d'obtenir des analogues de LRF, intéressants, connus. De plus, d'autres substitutions qui ne détruisent pas d'une façon

cb

significative l'efficacité des peptides peuvent être utilisées dans les peptides utilisés suivant l'invention, et des groupes acyle équivalents peuvent être substitués aux groupes entrant dans le cadre de R_1 .

REVENDEICATIONS

1. Procédé pour inhiber la spermatogenèse chez des mammifères mâles et pour empêcher ainsi la reproduction, caractérisé en ce qu'il consiste à administrer une quantité efficace d'un peptide ou d'un sel non toxique de celui-ci à un mammifère mâle, à un niveau de dosage journalier ne dépassant pas environ 3 mg par kg de poids de corps, ce peptide étant un antagoniste de LRF ayant une valeur de ICR_{50} inférieure à 1/1.

2. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en le peptide répond à la formule:

$R_1-R_2-R_3-D-Trp-Ser-Tyr-R_4-Leu-Arg-Pro-Gly-NH_2$
dans laquelle R_1 représente H ou un radical formyle, acétyle, acrylyle, benzoyle ou allyle, R_2 représente du déshydro Pro, du déshydro D-Pro, Thz ou D-Thz, R_3 représente pCl-D-Phe, pF-D-Phe, pNO₂-D-Phe, ou 3,4 Cl-D-Phe; R_4 représente D-Trp ou (imBzl) D-His, et Leu peut être substitué par N^αMe-Leu, et Gly-NH₂ peut être substitué par NHCH₂CH₃.

3. Procédé suivant la revendication 2, caractérisé en ce que R_2 représente du déshydro-Pro, et R_4 représente du D-Trp.

4. Procédé suivant la revendication 2, caractérisé en ce que R_4 représente du (imBzl)D-His.

5. Procédé suivant l'une ou l'autre des revendications 3 et 4, caractérisé en ce que R_3 représente du pCl-D-Phe.

6. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce que le peptide répond à la formule: Ac-déshydro

cb

15
Pro-pCl-D-Phe-D-Trp-Ser-Tyr-D-Trp-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂.

7. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce que le peptide répond à la formule :

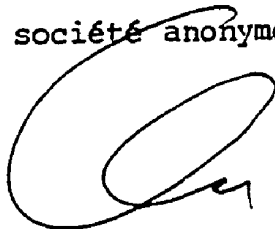
Ac-déshydro Pro-pCl-D-Phe-D-Trp-Ser-Tyr-D-Trp-N³MeLeu-Arg-Pro-Gly-NH₂.

8. Procédé pour inhiber la spermatogenèse chez les mammifères mâles et empêcher ainsi leur production, tel que décrit ci-dessus, notamment dans les Exemples donnés.

Bruxelles, le 25 juin 1981

P. Pon de THE SALK INSTITUTE FOR BIOLOGICAL STUDIES

P. Pon du Bureau GEVERS, société anonyme.

A large, stylized handwritten signature, likely of P. Pon, written in dark ink.