



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

237319
(11) (B2)

{51} Int. Cl.⁴
C 07 K 7/20
//A 61 K 37/02

{22} Přihlášeno 14 04 81

{21} (PV 2824-81)

{32} {31} {33} Právo přednosti od 29 08 80
(182594) Spojené státy americké

{40} Zveřejněno 14 12 84

{45} Vydáno 15 04 87

{72}
Autor vynálezu

RIVIER CATHARINE LAURE, LA JOLLA, KALIFORNIE,
RIVIER JEAN EDOUARD FREDERIC, LA JOLLA, KALIFORNIE,
VALE WYLIE WALKER, LA JOLLA, KALIFORNIE (Sp. st. a.)

{73}
Majitel patentu

THE SALK INSTITUTE FOR BIOLOGICAL STUDIES, LA JOLLA,
KALIFORNIE (Sp. st. a.)

{54} Způsob výroby peptidů inhibujících uvolňování gonadotropinů z hypofýzy savců

1

2

Způsob výroby peptidů inhibujících uvolňování gonadotropinů z hypofýzy savců obecného vzorce

X-R₁-R₂-R₃-Ser-Tyr-R₄-R₅-Arg-Pro-R₆,

kde jednotlivé substituenty mají význam uvedený v definici předmětu vynálezu, jakož i netoxických solí těchto peptidů, při němž se z meziprojektu obecného vzorce

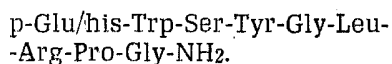
X¹-R₁-R₂-R₃-Ser(X²)-Tyr-(X³)-R₄-R₅-
-Arg(X⁴)-Pro-X⁵,

odštěpí alespoň jedna skupina X¹ až X⁵ a popřípadě se výsledný peptid převede na netoxickou sůl.

Vynález se týká způsobu výroby peptidů, které inhibují uvolňování gonadotropinů z hypofýzy savců včetně lidí; uvedenými peptidy je možno předcházet ovulaci a/nebo brzdit uvolňování steroidů. Jde tedy o peptidy, které způsobují inhibiční funkce pohlavních žláz a tím i uvolňování steroidních hormonů, progesteronu a testosteronu.

Hypofýza je připojena stopkou na bázi mozku v místě, které se nazývá hypothalamus. Hypofýza má dva laloky, přední a zadní. Zadní lalok této žlázy vyrábí a předává do oběhu dva hormony, které se produkují také v hypothalamu, a to vasopresin a oxytocin. Přední lalok hypofýzy vylučuje celou řadu hormonů, které jsou komplexními bílkovinami nebo molekulami glykoproteinů a dostávají se krevní cestou do různých orgánů a podporují vylučování jiných hormonů z periferních orgánů. Jde zejména o folikulostimulační hormon FSH a luteinizační hormon LH, kterým se obvykle říká také gonadotropiny nebo gonadotropní hormony. Tyto hormony řídí funkci pohlavních žláz, zejména výrobu testosteronu ve varlatech a progesteronu a estrogeneru ve vaječnících a mimoto také řídí zrání gamet.

Uvolňování hormonu předním lalokem hypofýzy obvykle vyžaduje předběžné uvolnění jiného hormonu, který se vyrábí v hypothalamu. Jeden z hypothalamických hormonů přímo vyvolává uvolnění gonadotropních hormonů, zvláště LH. Tento hypothalamický hormon uvolňující LH se nazývá LRF, přestože se někdy také uvádí jako LH-RH a GnRH. LRF byl izolován a analyzován jako decapeptid se strukturou



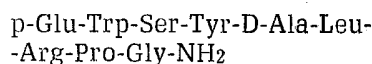
Peptidy jsou sloučeniny, které obsahují 2 nebo více aminokyselin, v nichž je karboxylová skupina jedné aminokyseliny vázána na aminoskupinu druhé kyseliny. Vzorec LRF, tak jak byl svrchu uveden odpovídá běžnému typu peptidů, kde aminoskupina se nachází na levé straně a karboxylová skupina na pravé straně. Poloha zbytku aminokyseliny se identifikuje počtem aminokyselinových zbytků zleva doprava. V případě LRF byla hydroxylová skupina karboxylové skupiny glycinu nahrazena aminoskupinou.

Zkratky pro jednotlivé zbytky aminokyselin jsou běžně používány a jsou založeny na jménech aminokyselin, p-Glu je kyselina pyroglutamová, His znamená histidin, Trp znamená tryptofan, Ser znamená serin, Tyr znamená tyrosin, Gly znamená glycin, Leu znamená leucin, Arg znamená arginin a Pro znamená prolin. S výjimkou glycinu jsou aminokyseliny v peptidech podle vynálezu v konfiguraci L, není-li uvedeno jinak.

Je známo, že při náhradě D-aminokyselin za glycin v poloze 6 decapeptidu LRF se získává peptidový materiál, jehož účinnost je 1 až 35krát vyšší než účinnost LRF, pokud

jde o uvolňování LH a dalších gonadotropinů v hypofýze savců. K tomuto účinku dochází v případě, že uvedený analog se podává savcům nitrožilně, podkožně, nitrosvalově, perorálně, nosem nebo do pochvy.

Je také známo, že při náhradě různých aminokyselin za His nebo při vynechání His v poloze 2 uvedeného decapeptidu vzniká analog s inhibičním účinkem na uvolňování LH a dalších gonadotropinů hypofýzou savců. Různých stupňů inhibice uvolňování LH se dosáhne v případě, že se His vynechá (des His) nebo nahradí D-Ala, D-Phe nebo Gly. Inhibiční účinek peptidů, modifikovaných v poloze 2 je možno dále zvýšit tak, že se zavede D-aminokyselina místo Gly v poloze 6 decapeptidu. Například peptid vzorce



je čtyřikrát účinnější jako inhibitor uvolňování gonadotropinu než tentýž peptid, který obsahuje Gly v poloze 6.

Některé samice savců, které nemají ovulační cyklus a které jsou zcela zdravé začnou vylučovat normální množství gonadotropinu LH a FSH po podání LRF. To znamená, že podání LRF je pravděpodobně vhodné pro ty případy sterility a infertility, jejichž příčinou je porucha v hypothalamu.

Je také možno předpokládat, že bude možno bránit ovulaci při podání analogů LRF. Z tohoto důvodu se zkoumají analogy LRF, které mohou být potenciálními antikoncepčními prostředky, jimiž je možno početí řídit. Bylo by žádoucí vyrábět peptidy, které mají silný antagonistický účinek a brzdí vylučování LH a uvolňování steroidů z pohlavních žláz savců.

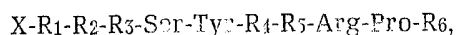
Předmětem vynálezu je způsob výroby peptidů, které inhibují uvolňování gonadotropinu u savců včetně člověka a je tedy při jejich použití možno brzdit uvolňování steroidů z pohlavních žláz samců i samic. Zlepšené analogy LRF antagonizují LRF a mají tedy inhibiční účinek na reprodukční pochody u savců. Je možno je použít k inhibici produkce gonadotropinů a pohlavních hormonů za různých okolností včetně předčasné puberty, nádorů, závislých na hormonech, dysmenorrhey a endometriózy.

Způsobem podle vynálezu je tedy možno získat peptidy, které působí silnou inhibiční gonadotropinů a inhibiční jejich uvolňování hypofýzou savců včetně lidí a/nebo inhibují uvolňování steroidů pohlavními žlázami. Tyto peptidy jsou analogy LRF, kde v poloze 1 se nachází dehydroprolin nebo kyselina metha-thiazolidin-2-karboxylová a s výhodou jsou také přítomny substituenty v polohách 2, 3 a 6. Substituent v poloze 1 může být modifikován tak, že na aminoskupinu v poloze α je vázána acylová skupina, například formyl, acetyl, akrylyl, vinylacetyl nebo benzo-yl. V poloze 1 je výhodný dehydro L-Pro.

V poloze 2 se s výhodou nachází modifikovaný D-Phe a v důsledku jeho přítomnosti vzrůstá antagonistická účinnost, zejména v závislosti na specifických modifikacích benzenového kruhu. Obvykle se nahrazuje jediný atom vodíku v poloze para nebo v poloze 4, při náhradě dvou atomů vodíku se substituce provádí s výhodou v polohách 2,4- nebo 3,4-. Substituenty se s výhodou volí ze skupiny dichlor, methyl, fluor, difluor, trifluor-methyl, methoxyskupina, brom, dibrom, nitroskupina, dinitroskupina, acetylaminoskupina a methylmerkaptoskupina. V poloze 3 je výhodný D-Trp a v poloze 6 imBzl D-His nebo D-Trp nebo některé jiné lipofilní aromatické D-aminokyseliny, přestože je možno použít také Gly nebo jakýkoliv D-isomer aminokyseliny, například D-Leu a D-Ser(O-terc-but). Substituce v poloze 7 a 10 se používá pouze ve zvláštních případech.

Protože tyto peptidy jsou vysoce účinné při inhibici LH, nazývají se často antagonisty LRF. Tyto peptidy inhibují ovulaci u samců savců při podávání velmi nízkých dávek v preestru a jsou také účinné při resorpci oplodněných vajíček v případě, že se podají velmi krátce po početí.

Předmětem vynálezu je způsob výroby peptidů inhibujících uvolňování gonadotropinů z hypofýzy savců obecného vzorce



kde

X znamená atom vodíku nebo acylovou skupinu až o 7 atomech uhlíku,

R₁ znamená dehydro Pro, dehydro D-Pro, Thz nebo D-Thz,

R₂ znamená D-Phe, D-His, D-Trp, Trp, Cl-D-Phe, dichlor-D-Phe, CF₃-D-Phe, F-D-Phe, difluor-D-Phe, AcNH-D-Phe,

kde

Ac znamená acetyl, NO₂-D-Phe, dinitro-D-Phe, Br-D-Phe, dibrom-D-Phe, CH₃S-D-Phe, OCH₃-D-Phe nebo CH₃-D-Phe,

R₃ znamená D-Trp, Trp, D-Phe, nebo D-His,

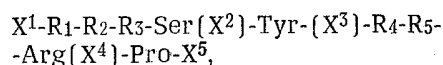
R₄ D-isomer lipofilní α-aminokyseliny ze skupiny Arg, Lys, Trp, Phe, His, Tyr a C-fenylglycin,

R₅ znamená Leu nebo N^α-Me-Leu

kde

Me znamená methyl,

R₆ znamená Gly-NH₂ nebo NHCH₂CH₃, jakož i netoxických solí těchto peptidů vyznačující se tím, že se z meziproductu obecného vzorce



kde

X¹ znamená ochrannou skupinu na α-aminoskupině,

X² znamená ochrannou skupinu na alkoholové hydroxylové skupině Ser,

X³ znamená ochrannou skupinu na fenolové hydroxylové skupině Tyr,

X⁴ znamená ochrannou skupinu na dusíkových atomech Arg a

X⁵ se volí ze skupiny Gly-O-CH₂-(pryskyřice), C-CH₂-(pryskyřice), Gly-NH-(pryskyřice), Gly-NH₂ a NHCH₂CH₃,

R₁, R₂, R₃, R₄ a R₅ mají svrchu uvedený význam, odštěpí alespoň jedna skupina X¹ až X⁵ a popřípadě se výsledný peptid převede na netoxickou sůl.

Pod pojmem dehydro Pro se rozumí 3,4-dihydroprolin vzorce C₅H₇O₂N, v případě, že X znamená acylový zbytek, je tento zbytek vázán na atom dusíku. Thz je kyselina metathiazolidin-2-karboxylová vzorce C₄H₇O₂NS, kterou je možno připravit reakcí cisteinhydrochloridu s formaldehydem a například Ac-Thz je možno získat reakcí Thz s anhydridem kyseliny octové.

Peptidy podle vynálezu je možno získat v pevné fázi při použití chlormethylované pryskyřice, methylbenzhydrylamínové pryskyřice (MBHA) nebo benzhydrylamínové pryskyřice (BHA). Reakce se provádí tak, že se postupně přidávají aminokyseliny tak, jak je podrobně uvedeno v US patentu číslo 4 211 693. Ochranné skupiny na postranním řetězci, tak jak je běžné v oboru známo, se s výhodou přidávají k Ser, Tyr, Arg a His předtím, než se tyto aminokyseliny váží na řetězec, vybudovaný na pryskyřici.

Tímto způsobem vzniká plně chráněný meziproduct peptidu, vázaného na pryskyřici.

Kritérium pro volbu postranního řetězce a ochranných skupin X² až X⁴ je skutečnost, že ochranné skupiny musí být stále k reakčním činidlům za reakčních podmínek, které se volí k odstranění α-aminoskupiny a ochranné skupiny na α-aminoskupině v každém stupni syntézy. Ochranná skupina nesmí být odštěpena v průběhu vazby a musí být možno ji odstranit po syntéze požadovaného sledu aminokyselin za reakčních podmínek, které nezmění peptidový řetězec.

Plně chráněný peptid je možno odštěpit od chlormethylové pryskyřice amonolýzou známým způsobem za vzniku plně chráněného meziproductu. Odstranění ochranných skupin a odštěpení peptidu od benzhydrylamínové pryskyřice se provádí při teplotě 0 °C působením kyseliny fluorovodíkové (HF). Před působením této kyseliny se k peptidu přidá anisol. Po odstranění kyseliny fluorovodíkové ve vakuu se působí na odštěpený peptid zbavený ochranných skupin etherem, výsledný produkt se izoluje dekantací, rozpustí se ve zředěné kyselině octové a lyofilizuje.

Čištění peptidu se provádí iontoměničovou chromatografií na sloupci karboxymethylcelulózy s následnou dělicí chromatografií při použití směsi n-butanolu a 0,1 N kyseliny octové v objemovém poměru 1:1 na sloupci, naplněném Sephadexem G-25 nebo při použití vysokotlaké kapalínové chromatografie.

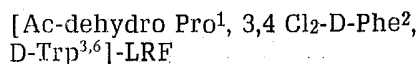
Peptidy podle vynálezu jsou účinné v dávkách nižších než 250 $\mu\text{g/kg}$ tělesné hmotnosti v případě použití v poledno při proestru a tímto způsobem je možno účinně bránit ovulaci u krysích samic. V případě, že je nutno potlačit ovulaci na delší dobu, je nutno použít dávek 0,1 až 5 mg/kg. Tyto látky jsou rovněž účinné jako antikoncepční látky v případě, že se podávají samcům.

Protože sloučeniny vyrobené způsobem podle vynálezu snižují hladiny testosteronu, což je u normálního samce nežádoucí, může být nutno podávat testosteron spolu s účinnou dávkou těchto látek.

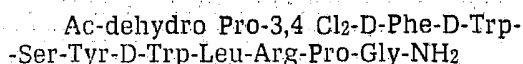
Tabulka I

Peptid	X	R ₂	R ₅	$\alpha_D^{22^\circ}$
1	Ac	3,4-Cl ₂ -D-Phe	Leu	-79,9
2	Ac	4 CF ₃ -D-Phe	Leu	-69,1
3	Ac	4 F-D-Phe	Leu	-78,2
4	Ac	4 AvNH-D-Phe	Leu	-76,5
5	Ac	4 NO ₂ -S-Phe	Leu	-89,6
6	Ac	4 Br-D-Phe	Leu	-76,0
7	Ac	4 CH ₃ S-D-Phe	Leu	-79,8
8	Ac	4 OCH ₃ -D-Phe	Leu	-82,7
9	Ac	4 CH ₃ -D-Phe	Leu	-81,7
10	Ac	2,4 Cl ₂ -D-Phe	Leu	-77,2
11	Acr	3,4 Cl ₂ -D-Phe	Leu	-72,5
12	Ac	4 OCH ₃ -D-Phe	N ^α MeLeu	-113,4
13	Ac	4 CH ₃ -S-Phe	N ^α MeLeu	-106,5
14	Ac	3,4 Cl ₂ -D-Phe	N ^α MeLeu	-110,—

Jako příklad bude dále uvedena syntéza peptidu č. 1, který je možno vyjádřit vzorcem



nebo podrobněji

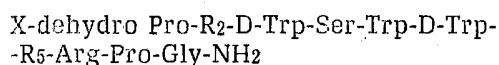


Použije se pryskyřice BHA a na pryskyřici

Vynález bude osvětlen následujícími příklady.

Příklad 1

Peptidy obecného vzorce



je možno připravit v pevné fázi svrchu uvedeným způsobem.

se naváže Gly s ochrannou skupinou Boc v průběhu 2 hodin v CH₂Cl₂ při použití trojnásobného přebytku Boc-derivátu a DCC jako aktivovaného reakčního činidla. Glycinové zbytky jsou napojeny na zbytek BHA amidovou vazbou.

Po navázání zbytku každé aminokyseliny, promytí, odstranění ochranné skupiny a vazbě dalšího zbytku aminokyseliny se navazuje další aminokyselina podle následujícího schématu, přičemž se používá automatické zařízení a začíná se s 5 g pryskyřice:

Stupeň	Reakční činidlo a postup	Reakční doba (min)
1	CH ₂ Cl ₂ promytí 80 ml dvakrát	3
2	methanol(MeOH) promytí 30 ml	3
3	CH ₂ Cl ₂ promytí 80 ml třikrát	3
4	50 % TFA s 5 % 1,2-ethandithiolu v CH ₂ Cl ₂ — 70 ml, dvakrát	10
5	CH ₂ Cl ₂ — 80 ml, dvakrát	3
6	TEA 12,5 % v CH ₂ Cl ₂ — 70 ml, dvakrát	5
7	MeOH — 40 ml, dvakrát	2
8	CH ₂ Cl ₂ — 80 ml třikrát	3
9	Boc-aminokyselina (10 mmolů) ve 30 ml DMF nebo CH ₂ Cl ₂ podle rozpustnosti chráněné aminokyseliny, jedenkrát a DCC (10 mmolů) v CH ₂ Cl ₂	30 až 300
10	MeOH — 40 ml, dvakrát	3
11	TEA 12,5 % v CH ₂ Cl ₂ — 70 ml), jedenkrát	3
12	MeOH — 30 ml, dvakrát	3
13	CH ₂ Cl ₂ — 80 ml, dvakrát	3

Po stupni 13 se odebere vzorek reakční směsi na ninhydrinový test. V případě, že tento test je negativní, je zapotřebí začít znovu na stupni 1 pro vazbu další aminokyseliny. Je-li test pozitivní nebo slabě pozitivní, je třeba opakovat stupně 9 až 13.

Svrchu uvedené schéma se používá pro vazbu aminokyselin v peptidu podle vynálezu po navázání první aminokyseliny. Ochranná skupina N^αBoc se používá pro každou další aminokyselinu v průběhu syntézy. Postranní řetězec Arg se chrání Tos. Jako ochranná skupina pro hydroxylovou skupinu Ser se použije OBZl a 2,6-dichlorbenzyl se použije jako ochranná skupina hydroxylové skupiny Tyr postranního řetězce. N-acetyldehydro-Pro se zavádí jako poslední aminokyselina, Boc-Arg(Tos) a Boc-D-Trp s nízkou rozpustností v CH₂Cl₂ se naváží při použití směsi dimethylformamidu a methylenchloridu.

Odštěpení peptidu z pryskyřice a úplné odstranění ochranných skupin na postranním řetězci lze snadno provést působením kyseliny fluorovodíkové při teplotě 0 °C. Před působením kyseliny se přidá anisol. Po odstranění kyseliny ve vakuu se pryskyřice extrahuje 50% kyselinou octovou a promývací kapalina se lyofilizuje, čímž se získá surový peptid ve formě prášku.

Čištění peptidu se pak provádí iontoměničovou chromatografií na karboxymethylcelulóze (Whatman CM 32) při použití 0,05 až 0,3 M octanu amonného ve směsi methanolu a vody v poměru 50 : 50 s následnou dělicí

chromatografií filtrací na gelu při použití směsi n-butanolu a 0,1 N kyseliny octové v objemovém poměru 1 : 1.

Peptidy uvedené v tabulce byly zkoumány in vitro a in vivo. Při testu in vitro bylo použito buněk kryší hypofýzy, která byla pěstována v kultuře 4 dny před pokusem. Hladiny LH byly mírou odpovědi na aplikaci peptidů, výsledky byly zjišťovány radioimunologicky. Kontrolní vzorky buněk obsahovaly 3 mol LRF, pokusné buňky obsahovaly 3 mol LRF a 0,01 až 3 mol peptidu, získaného způsobem podle vynálezu. Pak bylo srovnáváno množství LH vylučovaného kontrolními vzorky a pokusnými vzorky. Výsledky byly propočítány a jsou uvedeny v tabulce IA jako molární koncentrační poměr zkoumaného peptidu k LRF, kterého je zapotřebí ke snížení množství LH, uvolňovaného 3 mol LRF na 50 % kontrolní hodnoty (ICR₅₀).

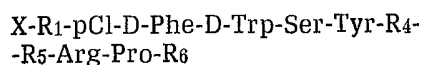
Svrchu popsané peptidy byly použity k zábraně ovulace u kryších samic. Při tomto testu byly použity dospělé samice Sprague-Dowley o hmotnosti 225 až 250 g, samicím bylo podáno 5 nebo 10 µg peptidu v kukuřičném oleji v poledne při proestru. Proestrus je odpoledne před ovulací. Oddělená kontrolní skupina byla ponechána bez podání peptidu. U každé z kontrolních krys se dostavila ovulace. Jak je zřejmé z následující tabulky, peptidy účinně potlačily ovulaci u kryších samic ve velmi nízkých dávkách a všechny peptidy byly zcela účinné v dávce 1 mg.

Tabulka IA

Peptid	In vitro ICR ₅₀	In vivo (10 µg) počet ovulujících krys	In vivo (5 µg) počet ovulujících krys
1	0,039	0/10	4/7
2	0,070		7/9
3	0,021	0/10	0/10
4		9/10	
5	0,011	0/10	2/10
6	0,010		5/7
7	0,030	1/10	7/10
8	0,125	3/10	
9	0,044	1/7	9/9
10		5/10	4/7
11	0,048	1/10	4/10
12	0,29	5/10	
13	0,11	3/4	
14	0,05	1/3	8/10

Příklad 2

Peptidy obecného vzorce



je možno získat v pevné fázi způsobem podle příkladu 1 s výjimkou peptidu č. 20, který se získá na chlormethylované pryskyřici.

Tabulka II

Peptid	X	R ₁	R ₄	R ₅	R ₆	α_D^{20}
15	Ac	dehydro Pro	D-Trp	Leu	Gly-NH ₂	-92,3
16	Ac	dehydro Pro	D-Trp	N ^α MeLeu	Gly-NH ₂	-110,5
17	Ac	dehydro D-Pro	D-Trp	Leu	Gly-NH ₂	+5,2
18	Ac	dehydro D-Pro	D-Trp	N ^α MeLeu	Gly-NH ₂	-21,1
19	Ac ^r	dehydro Pro	D-Trp	N ^α MeLeu	Gly-NH ₂	-69,2
20	Ac	dehydro D-Pro	D-Trp	Leu	NHCH ₂ CH ₃	
21	Ac	Thz	D-Trp	Leu	Gly-NH ₂	-51,9
22	Ac	Thz	D-Trp	N ^α MeLeu	Gly-NH ₂	-19,0
23	Ac	D-Thz	D-Trp	N ^α MeLeu	Gly-NH ₂	-46,5
24	Ac	D-Thz	D-Trp	Leu	Gly-NH ₂	-17,7
25	Ac	dehydro Pro	(imBzl)D-His	Leu	Gly-NH ₂	
26	Ac	dehydro D-Pro	(imBzl)D-His	Leu	Gly-NH ₂	+18,2
27	Ac	Thz	(imBzl)D-His	Leu	Gly-NH ₂	-41,3
28	Ac	D-Thz	(imBzl)D-His	Leu	Gly-NH ₂	-7,7

Peptidy uvedené v tabulce byly zkoumány in vitro a in vivo. Pokus in vitro byl opět proveden při použití disociovaných buněk krysí hypofýzy, které byly pěstovány v kultuře 4 dny před pokusem. Hladiny LH vznikající jako odpověď na aplikaci peptidu byly zjišťovány radioimunologicky.

Kontrolní vzorky byly pěstovány v prostředí s 3 mol LRF, pokusné buňky v prostředí se 3 mol LRF a mimoto 1 až 100 mol zkoumaného peptidu. Množství LH vylučovaného kontrolními vzorky bylo srovnáno s množstvím, které bylo vylučováno vzorky pokusnými. Výsledky byly propočítány a jsou uvedeny v tabulce IIA jako poměr molární koncentrace zkoumaného peptidu ke koncentraci LRF, kterého je zapotřebí ke

snížení množství uvolňovaného LH na 50 % kontrolní hodnoty. [ICR₅₀].

Některé peptidy byly použity k zábraně ovulace u krysích samic. Při provádění tohoto pokusu bylo použito 4, 7, 9 nebo 10 dospělých krys Sprague-Dawley o hmotnosti 225 až 250 g, krysám bylo podáno 0,02 mg peptidu, není-li uvedeno jinak v kukuřičném oleji v poledně při proestru. Proestrus je odpoledne před ovulací. Kontrolní skupinu tvořilo 10 krysích samic, kterým nebyl podán peptid. Všechny krysy z kontrolní skupiny ovulovaly. Jak je uvedeno v následující tabulce, byly peptidy účinné při zábraně ovulace u krysích samic ve velmi nízkých dávkách a všechny peptidy byly úplně účinné v dávce 1 mg.

Tabulka IIA

Peptid	In vitro ICR ₅₀	in vivo počet ovulujících krys
15	0,043	0/10*
16	0,058	0/7
17	0,19	3/8
18	0,27	5/10**
19	0,03	0/9
20	0,2	
21	0,14	5/8
22	0,13	9/10**
23	0,1	
24	0,12	
25	0,042	4/10
26	0,2	10/10
27	0,15	7/10**
28	0,1	7/10**

* 0,025 mg ** 0,010 mg

Příklad 3

Peptidy vzorce

X-R1-R2-R3-Ser-Tyr-D-Trp-R5-Arg-Pro-R6

je možno získat v pevné fázi příkladu 1 s výjimkou peptidu č. 37, v jehož případě se použije chlormethylované pryskyřice.

Tabulka III

Peptid	X	R ₁	R ₂	R ₃	R ₅	R ₆	α_D^{20}
29	H	dehydro-D,L-Pro	D-Phe	D-Trp	N ^ε MeLeu	Gly-NH ₂	—57,7
30	H	dehydro-D,L-Pro	D-Phe	D-Trp	Leu	Gly-NH ₂	
31	Ac	dehydro-D,L-Pro	D-Phe	D-Trp	Leu	Gly-NH ₂	—22,7
32	H	dehydro-D,L-Pro	D-Phe	D-Trp	N ^ε MeLeu	Gly-NH ₂	
33	Ac	dehydro-Pro	D-Phe	D-Trp	Leu	Gly-NH ₂	—77,7
34	Ac	dehydro-D-pro	D-Phe	D-Trp	Leu	Gly-NH ₂	
35	H	dehydro-Pro	D-Phe	D-Trp	Leu	Gly-NH ₂	
36	H	dehydro-D-pro	D-Phe	D-Trp	Leu	Gly-NH ₂	
37	H	dehydro-Pro	D-Phe	D-Trp	Leu	Gly-NH ₂	
38	Bz	dehydro-Pro	D-Phe	D-Trp	Leu	NHCH ₂ CH ₃	
39	For	dehydro-Pro	D-Trp	D-Trp	Leu	Gly-NH ₂	
40	For	dehydro-Pro	D-Trp	D-Phe	Leu	Gly-NH ₂	
41	Ac	dehydro-Pro	D-His	Trp	Leu	Gly-NH ₂	
42	Bz	dehydro-Pro	D-His	Trp	Leu	Gly-NH ₂	
43	Ac	dehydro-Pro	Trp	D-His	Leu	Gly-NH ₂	
			Trp	D-Trp	Leu	Gly-NH ₂	

Peptidy uvedené v tabulce byly zkoumány in vitro a in vivo. Pokus in vitro byl opět proveden při použití disociovaných buněk krysí hypofýzy, které byly pěstovány v kultuře 4 dny před pokusem. Hladiny vznikající jako odpověď na aplikaci peptidu byly zjišťovány radioimunologicky. Kontrolní vzorky buněk byly pěstovány v prostředí s 3 mol LRF, pokusné buňky v prostředí se 3 mol LRF a mimoto 1 až 100 mol zkoumaného peptidu. Množství LH vylučovaného kontrolními vzorky bylo srovnáno s množstvím, které bylo vylučováno vzorky pokusnými. Výsledky byly propočítány a jsou uvedeny v tabulce IIIA jako poměr molární koncentrace zkoumaného peptidu ke koncentraci LRF, kterého je

zapotřebí ke snížení množství uvolňovaného LH na 50 % kontrolní hodnoty (ICR₅₀).

Některé peptidy byly použity k zábraně ovulace u krysích samic, při provádění tohoto pokusu bylo použito 4, 7, 9 nebo 10 dospělých krys Sprague-Dawley o hmotnosti 225 až 250 g, krysám bylo podáno 0,2 mg peptidu, není-li uvedeno jinak v kukuřičném oleji v poledne při proestru. Proestrus je odpoledne před ovulací. Kontrolní skupinu tvořilo 10 krysích samic, kterým nebyl podán peptid. Všechny krysy z kontrolní skupiny ovulovaly. Jak je uvedeno v následující tabulce, byly peptidy účinné při zábraně ovulace u krysích samic ve velmi nízkých dávkách a všechny peptidy byly úplně účinné v dávce 1 mg.

Tabulka IIIA

Peptid	In vitro ICR ₅₀	in vivo počet ovulujících krys
29	0,5 : 1	4/10
30	0,8 : 1	7/10
31	0,3 : 1	1/10
32	0,4 : 1	2/10
33	0,6 : 1	0/4*

* 0,025 mg

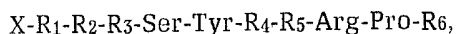
Tyto peptidy je možno podávat savcům nitrožilně, podkožně, nitrosvalově, perorálně, intranazálně nebo do pochvy, čímž je možno dosáhnout inhibici a/nebo řízení fertility. Účinná dávka se pohybuje v závislosti na cestě podání a druhu savce. Příkladem typické formy pro podání je fyziologický roztok chloridu sodného s obsahem peptidu. Tento roztok se podává tak, aby bylo možno

zaručit dávku 0,1 až 5 mg/kg. Perorálně je možno peptidy podávat v pevné nebo kapalné formě.

Přestože vynález byl popsán na základě výhodných provedení, je zcela zřejmé, že je možno navrhnout řadu modifikací, spadající rovněž do oboru vynálezu, je například možno použít jiné substituenty, které se podstatně neliší účinností výsledného peptidu.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob výroby peptidů inhibujících uvolňování gonadotropinů z hypofýzy savců obecného vzorce



kde

X znamená atom vodíku nebo acylovou skupinu až o 7 atomech uhlíku,

R₁ znamená dehydro Pro, dehydro D-Pro, Thz nebo D-Thz,

R₂ znamená D-Phe, D-His, D-Trp, Trp, Cl-D-Phe, dichlor-D-Phe, CF₃-D-Phe, F-D-Phe, difluor-D-Phe, AcNH-D-Phe,

kde

Ac znamená acetyl, NO₂-D-Phe, dinitro-D-Phe, Br-D-Phe, dibrom-D-Phe, CH₃S-D-Phe, OCH₃-D-Phe nebo CH₃-D-Phe,

R₃ znamená D-Trp, Trp, D-Phe nebo D-His,

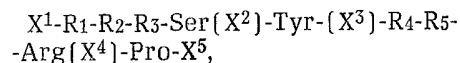
R₄ D-isomer lipofilní α-aminokyseliny ze skupiny Arg, Lys, Trp, Phe, His, Tyr a C-fenylglycin,

R₅ znamená Leu nebo N^α-Me-Leu

kde

Me znamená methyl,

R₆ znamená Gly-NH₂ nebo NHCH₂CH₃, jakož i netoxických solí těchto peptidů, významující se tím, že se z meziprojektu obecného vzorce



kde

X¹ znamená ochrannou skupinu na α-aminoskupině,

X² znamená ochrannou skupinu na alkoholové hydroxylové skupině Ser,

X³ znamená ochrannou skupinu na fenolové hydroxylové skupině Tyr,

X⁴ znamená ochrannou skupinu na dusíkových atomech Arg a

X⁵ se volí ze skupiny Gly-O-CH₂(pryskyřice), O-CH₂-(pryskyřice), Gly-NH-(pryskyřice), Gly-NH₂ a NHCH₂CH₃,

R₁, R₂, R₃, R₄ a R₅ mají svrchu uvedený význam,

odštěpí alespoň jedna skupina X^1 až X^5 a po případě se výsledný peptid převede na netoxickou sůl.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se vychází z meziprojektu, v němž X^1 znamená acylovou skupinu až o 7 atomech uhlíku, R_2 znamená 3,4-Cl-D-Phe a R_5 znamená Leu a zbývající substituenty mají význam uvedený v bodu 1.

3. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se vychází z meziprojektu, v němž X^1 znamená acylovou skupinu až o 7 atomech uhlíku, R_2 znamená 4 F-D-Phe a R_5 znamená Leu a zbývající substituenty mají význam uvedený v bodu 1.

4. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se vychází z meziprojektu, v němž X^1 znamená acylovou skupinu až o 7 atomech uhlíku, R_2 znamená 4 NO₂-D-Phe a R_5 znamená Leu a zbývající substituenty mají význam uvedený v bodu 1.

5. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se vychází z meziprojektu, v němž X^1 znamená acylovou skupinu až o 7 atomech uhlíku, R_2 znamená 2,4 Cl₂-D-Phe a R_5 znamená Leu a zbývající substituenty mají význam uvedený v bodu 1.

6. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se vychází z meziprojektu, v němž X^1 znamená acylovou skupinu až o 7 atomech uhlíku, R_2 znamená 3,4 Cl-D-Phe a R_5 znamená Leu a zbývající substituenty mají význam uvedený v bodu 1.

7. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se vychází z meziprojektu, v němž X^1 znamená acylovou skupinu až o 7 atomech uhlíku, R_2 znamená 3,4 Cl₂-D-Phe a R_5 znamená N^αMeLeu a zbývající substituenty mají význam uvedený v bodu 1.

8. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se vychází z meziprojektu, v němž X^1 znamená acylovou skupinu až o 7 atomech uhlíku, R_1 znamená dehydro-Pro, R_4 znamená D-Trp, R_5 znamená Leu a X^5 znamená Gly-NH₂ a zbývající substituenty mají význam uvedený v bodu 1.

9. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se vychází z meziprojektu, v němž X^1 znamená acylovou skupinu až o 7 atomech uhlíku, R_1 znamená dehydro-Pro, R_4 znamená D-Trp, R_5 znamená N^αMeLeu a X^5 znamená Gly-NH₂ a zbývající substituenty mají význam uvedený v bodu 1.

10. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se vychází z meziprojektu, v němž X^1 znamená acylovou skupinu až o 7 atomech uhlíku, R_1 znamená dehydro Pro, R_4 znamená D-Trp, R_5 znamená N^αMeLeu a X^5 znamená Gly-NH₂ a zbývající substituenty mají význam uvedený v bodu 1.

11. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se vychází z meziprojektu, v němž X^1 znamená acylovou skupinu až o 7 atomech uhlíku, R_1 znamená dehydro Pro, R_4 znamená (imBzl)D-His, R_5 znamená Leu a X^5 znamená Gly-NH₂ a zbývající substituenty mají význam uvedený v bodu 1.