



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101553500 B

(45) 授权公告日 2014. 01. 01

(21) 申请号 200780026537. 3

(22) 申请日 2007. 05. 01

(30) 优先权数据

60/805, 042 2006. 06. 16 US

60/805, 181 2006. 06. 19 US

0616111. 1 2006. 08. 12 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2009. 01. 13

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2007/001586 2007. 05. 01

(87) PCT国际申请的公布数据

W02007/144554 EN 2007. 12. 21

(73) 专利权人 医疗研究局

地址 英国威尔特郡

(72) 发明人 R·P·米勒 S·R·莫兹利

R·洛佩斯德马图拉纳加门迪亚

(74) 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司

公司 11314

代理人 程伟

(51) Int. Cl.

C07K 7/23(2006. 01)

A61K 38/09(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1179181 A, 1998. 04. 15, 全文.

CN 1200674 A, 1998. 12. 02, 全文.

WO 99/49059 A2, 1999. 09. 30, 全文.

审查员 周茂新

权利要求书1页 说明书34页

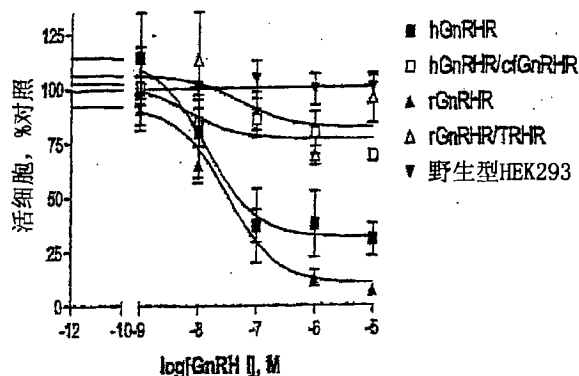
序列表27页 附图14页

(54) 发明名称

GNRH(促性腺激素释放激素)肽衍生物

(57) 摘要

本发明人发现,取代GnRH I(促性腺激素释放激素)肽序列的位置5和/或7和/或8的氨基酸残基,以及特别地除去位置8的精氨酸残基可引起增强的抗增殖活性。而且,在GnRH II肽序列的位置6引入一定的D-氨基酸残基可引起增强的抗增殖活性。这个令人惊奇的发现提供了用于治疗抗增殖性失调例如癌症的有力的和选择性的试剂。



1. 一种由以下肽序列组成的试剂在制备用于治疗增殖性失调的药物中的用途,其中肽序列选自:

- i-1)pLGlu-LHis-LTrp-LSer-LHis-DArg-LTrp-LTyr-LPro-Gly. NH<sub>2</sub> ;
- ii-1)pLGlu-LHis-LTrp-LSer-LHis-DTrp-LTrp-LTyr-LPro-Gly. NH<sub>2</sub> ;
- iii-1)pLGlu-LHis-LTrp-LSer-LTyr-DLys-LTrp-LGln-LPro-Gly. NH<sub>2</sub> ;
- iv-1)pLGlu-LHis-LTrp-LSer-LTyr-DLys-LTrp-LLeu-LPro-Gly. NH<sub>2</sub> ;
- v-1)pLGlu-LHis-LTrp-LSer-LTyr-DLys-LTrp-LTyr-LPro-Gly. NH<sub>2</sub> ;
- v-2)pLGlu-LHis-LTrp-LSer-LTyr-DLys-LTrp-LArg-LPro-Gly. NH<sub>2</sub> ;
- vi-1)pLGlu-LHis-LTrp-LSer-LTyr-DTrp-LTrp-LArg-LPro-Gly. NH<sub>2</sub> ;
- vii-1)pLGlu-LHis-LTrp-LSer-LHis-DLys-LTrp-LTyr-LPro-Gly. NH<sub>2</sub> ;
- viii-1)pLGlu-LHis-LTrp-LSer-LHis-DArg-LTrp-LTyr-LPro. NHEt ;
- ix-1)pLGlu-LHis-LTrp-LSer-LHis-DArg-LLeu-LArg-LPro-Gly. NH<sub>2</sub> ;
- x-1)pLGlu-LHis-LTrp-LSer-LHis-DTrp-LTrp-LArg-LPro-Gly. NH<sub>2</sub> ;
- xi-1)pLGlu-LHis-LTrp-LSer-LHis-DTrp-LLeu-LArg-LPro-Gly. NH<sub>2</sub> ;
- xii-1)pLGlu-LHis-LTrp-LSer-LHis-DTyr-LLeu-LArg-LPro-Gly. NH<sub>2</sub> ;
- xiii-1)pLGlu-LHis-LTrp-LSer-LHis-DAla-LTrp-LTyr-LPro-Gly. NH<sub>2</sub> ;
- xiv-1)pLGlu-LHis-LTrp-LSer-LHis-DSer-LTrp-LTyr-LPro-Gly. NH<sub>2</sub>.

2. 一种由选自以下的肽序列组成的试剂:

- w1)pLGlu-LHis-LTrp-LSer-LHis-DArg-LTrp-LTyr-LPro. NHEt ;
- x1)pLGlu-LHis-LTrp-LSer-LHis-DArg-LTrp-LTyr-LPro-Gly. NH<sub>2</sub> ;
- y1)pLGlu-LHis-LTrp-LSer-LHis-DArg-LLeu-LArg-LPro-Gly. NH<sub>2</sub> ;
- z1)pLGlu-LHis-LTrp-LSer-LHis-DSer-LTrp-LTyr-LPro-Gly. NH<sub>2</sub>.

3. 如权利要求2所定义的试剂在制备防止和/或减少一个或一个以上细胞增殖的药物中的用途。

4. 根据权利要求3所述的用途,其中细胞是人类或动物体的细胞。

5. 如权利要求2所定义的试剂在制备用于治疗具有潜在易感性的细胞的个体的药物中的用途。

6. 根据权利要求5所述的用途,其中细胞为癌细胞。

## GNRH (促性腺激素释放激素) 肽衍生物

[0001] 本申请涉及用于药物的试剂、组合物和方法。特别地,本发明涉及与 GnRH 肽相关的试剂。

[0002] 在人类中至少存在两种形式的促性腺激素释放激素 (GnRH)。虽然对 GnRH II 的生物学作用知之甚少,但是我们知道 GnRH I 是哺乳动物繁殖的神经内分泌控制的中心调节子。从下丘脑神经元释放的 GnRH I 与垂体前叶 (anterior pituitary) 中的它的特异性的、G 蛋白偶联受体 (GPCR) 相结合,最终促进促性腺激素的合成和释放 (Kaiser 等人,1997; Millar 等人,2004)。GnRH 另外还对垂体外组织 (extra-pituitary tissues) 和几种类型的癌症,特别是生殖系统癌症具有效应。在这些肿瘤中已经发现了激素的 mRNA 和受体,在体外和体内已经表明 GnRH 对细胞生长的直接的抑制 (Limonta 等人,2003 和 Grundker 等人,2002 进行了综述)。对这个新型作用的研究是非常新的,产生了相反的数据收集。例如,在肿瘤细胞中发现两个不同的结合位点和药理学上不同的受体,这引起一些研究者建议第二种受体亚型 (命名为 II 型,以与 I 型垂体受体相对) (Enomoto 等人,2004; Grundker 等人,2004; Neill 等人,2004)。但是,虽然在一些灵长类中已经克隆了 II 型受体,但是在人类中还没有发现功能性替代亚型 (Morgan 等人,2003)。而且,在妇科癌症中发现的 mRNA 和 cDNA 对应于 I 型受体 (Limonta 等人,2003)。

[0003] GnRH 调节其抗增殖作用的分子机制也是一个争论的问题。一些证据表明,不像垂体受体 (其结合至 Gq) (Grundker 等人,2002; Limonta 等人,2003),在肿瘤中表达的受体主要结合至 Gi。其他待激活的多种细胞内途径已经被命名,包括生长因子作用的下调 (通过生长因子及其受体表达的减少和磷酸化酪氨酸磷酸酶的激活)、Akt 和 60s 核糖体磷酸化蛋白的抑制 (分别抑制细胞生存和蛋白合成) 和几个促有丝分裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPK) 的激活 (Grundker 2001; Chen 等人,2002; Kim 等人,2004b; Kimura 等人,1999; Kraus 等人,2004; Tanaka 等人,2003)。细胞生长调节之上的 GnRH 暴露的结果毫无疑问由细胞类型 (规定细胞内的内容和类固醇激素对增殖的依赖性)、治疗体制和其他的 (有时为未明的) 因素决定。

[0004] GB 2,237,571A 涉及促性腺激素释放激素类似物。Folkers 等人 (1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 82:1070-1074) 涉及与促黄体化激素释放激素生物学等价的十肽。Millar 等人 (1989, J. Biol. Chem., 35:21007-21013) 涉及脊椎动物促性腺激素释放激素的嵌合类似物。

[0005] 以前已经将 GnRH 肽用于治疗增殖性失调 (通过调节垂体腺的激素释放),例如癌症。但是,最近证明:抗增殖也是配体的一个内在特性,其能够优先激活特定的信号级联反应,该事件被称为配体诱导的选择性信号传导的事件 (LISS) (Maudsley 等人,2004; Millar & Pawson, 2004)。这解释了被刻画为拮抗剂的配体是如何通过相同的受体进行对其他细胞类型细胞的细胞生长抑制,因为他们不激活垂体受体。迄今为止,鉴定出极少的具有这些特性的配体。

[0006] 本发明人确定了与细胞生长抑制相关的 GnRH I 和 GnRH II 肽的结构性要求并令人惊奇地发现,GnRH I 和 GnRH II 肽的抗增殖活性可通过取代肽序列中的特定氨基酸残基

来进行调节。

[0007] 人类 GnRH I 的肽序列（使用氨基酸残基的三字符密码子进行显示）为 :pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly. NH<sub>2</sub>。

[0008] 人类 GnRH II 的肽序列（使用氨基酸残基的三字符密码子进行显示）为 :pGlu-His-Trp-Ser-His-Gly-Trp-Tyr-Pro-Gly. NH<sub>2</sub>。

[0009] 特别地,本发明人发现,在 GnRH I 肽序列的位置 5 和 / 或 7 和 / 或 8 取代氨基酸残基（特别地在位置 8 除去精氨酸残基）可导致增强的抗增殖活性。而且,在 GnRH II 肽序列的位置 6 引入一定的 D- 氨基酸残基可导致增强的抗增殖活性。这个令人惊奇的发现提供了用于治疗抗增殖性失调（例如癌症）的有力的和选择性试剂。

[0010] 相应地,在第一个方面,本发明提供了用于药物的包含以下肽序列的试剂:

[0011] pGlu-His-Trp-Ser-R1-Gly-R2-R3-Pro-A, 其中:

[0012] a) R1 是 His, R2 是 Leu 和 R3 是 Arg ;或

[0013] b) R1 是 Tyr, R2 是 Trp 和 R3 是 Arg ;或

[0014] c) R1 是 Tyr, R2 是 Leu 和 R3 是 Tyr ;或

[0015] d) R1 是 His, R2 是 Trp 和 R3 是 Arg ;或

[0016] e) R1 是 His, R2 是 Leu 和 R3 是 Tyr ;或

[0017] f) R1 是 Tyr, R2 是 Trp 和 R3 是 Tyr ;

[0018] 且其中 A 选自:

[0019] Z ;或

[0020] azaGly ;或

[0021] azaGly. Z ;或

[0022] DAla. Z ;或

[0023] Glu. Z ;或

[0024] DAla-Glu. Z ;或

[0025] DAla-DAla. Z ;或

[0026] β Ala. Z ;或

[0027] Pro ;或

[0028] Pro. Z

[0029] DAla-Gly. Z ;或

[0030] Gly. Z,

[0031] 其中 Z 是除去了 C 末端氨基酸残基上电荷的基团。

[0032] 优选地, Z 具有小于 200 的分子量, 优选为小于 150, 优选为小于 100。优选地, Z 是 NHR', 其中 R' 是 H 或 C<sub>1</sub> 至 C<sub>4</sub> 烷基或者 Z 是 OR", 其中 R" C<sub>1</sub> 至 C<sub>4</sub> 烷基。优选地, Z 是酰胺。优选地, Z 是 NH<sub>2</sub> 或 N- 丙胺或 N- 乙胺 (NH<sub>2</sub>Et) 或 N- 甲胺或 N- 丁胺。

[0033] 缩写 "pGlu" 代表经修饰的氨基酸, 焦谷氨酸盐 (pyroglutamate)。

[0034] 优选地, A 是 azaGly. NH<sub>2</sub>。缩写 "azaGly" 代表氮杂甘氨酸 (azaglycine), 其中 C-H 基团被氮原子所取代。缩写 "azaGly. NH<sub>2</sub>" 代表氮杂甘氨酸的酰胺化形式。

[0035] 优选地, A 是 DAla. NH<sub>2</sub> 或 Glu. NH<sub>2</sub>。缩写 "DAla. NH<sub>2</sub>" 和 "Glu. NH<sub>2</sub>" 代表分别 D- 丙氨酸残基和谷氨酸盐残基的酰胺化形式。

[0036] 优选地, A 是 DAla-Glu. NH<sub>2</sub> 或 DAla-DAla. NH<sub>2</sub> 或 DAla-Gly. NH<sub>2</sub>。

[0037] 优选地, A 是  $\beta$  Ala. NH<sub>2</sub>。缩写“ $\beta$  Ala”代表  $\beta$ -丙氨酸, 丙氨酸的一种经修饰的形式, 其中氨基基团位于相对于羧基基团的  $\beta$  (贝塔) 位置。缩写“ $\beta$  Ala. NH<sub>2</sub>”代表  $\beta$ -丙氨酸的氨酰化形式。

[0038] 优选地, A 是 Pro. Z, 其中 Z 选自 NH<sub>2</sub>、N-丙胺、N-乙胺、N-甲胺或 N-丁胺。

[0039] 缩写“Gly. NH<sub>2</sub>”代表甘氨酸残基的酰胺化形式。优选地, 本发明的试剂在其 C 末端含有不带电的 C 末端残基, 这可通过用 C 末端基团例如 NH<sub>2</sub> 或 NHEt (N-乙胺) 进行修饰来实现。

[0040] “试剂”包括盐 (例如有机或无机酸加成盐)、酯和包含或由本发明的肽序列组成的分子的溶剂化物。应该认识到, 本术语还包括与相关试剂具有相同的生物学功能和/或活性的衍生物。而且, 对于本发明的目的来说, 该术语也包括相关试剂的前药 (例如酯)。术语“前药”包括任何物质组合物, 其经口服或非肠道使用之后, 可在体内代谢而形成实验可测数量的和在预先确定的服药时间内的相关试剂。

[0041] 优选地, 本发明的试剂能够可逆地或非可逆地结合至 GnRH 受体, 且优选地能够选择性地结合至 GnRH 受体。“选择性结合”包括本发明试剂能够以相对于另一个多肽强至少十倍的能力结合至 GnRH 受体; 优选为强至少 50 倍, 更优选为强至少 100 倍。优选地, 本发明的试剂在生理条件下结合至 GnRH 受体, 例如, 在体内。

[0042] 本发明的试剂可进一步由一个或一个以上部分组成或包含一个或一个以上部分, 该部分能够将本发明的试剂靶向或者定位于靶细胞 (例如癌细胞) 和/或增加本发明试剂的半衰期 (t<sub>1/2</sub>)。因此, 这样的部分可增加本发明试剂的功效。优选地, 当本发明的试剂在肽序列的位置 6 包含或者由 D-氨基酸 (优选为 D-Lys 或 D-Glu 或 D-Asp 或 D-Cys) 组成时可包括一个或一个以上部分, 因为那些氨基酸残基特别易于进行修饰。

[0043] 优选地, 一个或一个以上部分是类固醇激素分子 (包括例如孕酮、睾丸激素、雌二醇或皮质醇), 且偶联至 D-氨基酸的侧链。类固醇激素分子能够结合血浆蛋白且被表明可降低 GnRH 肽的代谢清除 (Ratcliffe 等人, 2006, *Endocrinology*, 147 :571-9)。在 W02004/08725 中描述了偶联至类固醇激素的 GnRH 肽, 这里引入作为参考。或者, 一个或一个以上部分为维生素, 例如维生素 B12 和维生素 D, 且偶联至 D-氨基酸的侧链。已经表明维生素可改善 GnRH 肽的口服的生物利用率 (Russell-Jones 等人, 1995, *Bioconjug. Chem.* , 6 : 34-42 ; Russell-Jones 等人, 1995, *Bioconjug. Chem.* , 6 :459-465)。

[0044] 优选地, 一个或一个以上部分不影响和/或不显著性地影响本发明的试剂结合至并激活 GnRH 受体的能力。

[0045] 几个因素决定本发明试剂的抗增殖活性, 包括对 GnRH 受体的亲和力以及和分娩信号途径相关细胞内机制的受体的结合。因此, 本发明试剂的抗增殖活性不是单单由对 GnRH 受体的亲和力决定的, 例如, 本发明的两个试剂可显示出不同的抗增殖活性但是对于 GnRH 受体具有相同的亲和力。

[0046] GnRH 受体是 G 蛋白偶联受体 (GPCR), 其具有七个跨膜结构域 (7TM)。例如 Tsutsumi 等人 (1992, *Mol. Endocrinol.* , 6 :1163-1169) 和 Kakar 等人 (1992, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* , 189 :289-295) 和 Chi 等人 (1993, *Mol. Cell. Endocrinol.* , 91 :R1-6) 描述了这样的受体的克隆和鉴定。

[0047] 确定 GnRH 肽（或其类似物）与 GnRH 受体结合的方法包括竞争性结合测试，如 Tsutsumi 等人（1992, Mol. Endocrinol., 6 :1163-1169）和 Kakar 等人（1992, Biochem. Biophys. Res. Comm., 189 :289-295）和 Chi 等人（1993, Mol. Cell. Endocrinol., 91 :R1-6）所描述。简单来说，在那个方法中，用  $I^{125}$  来标记感兴趣的肽或其类似物，在表达 GnRH 受体的全细胞中或在包含 GnRH 受体的膜中存在未标记肽的情况下测定结合。

[0048] 在第二个方面，本发明提供了用于药物的包含以下肽序列的试剂：

[0049] pGlu-His-Trp-Ser-Tyr/His-Gly-Leu/Trp-R4-Pro-A

[0050] 其中：R4 是除了精氨酸以外的任何氨基酸，且 A 选自：

[0051] Z；或

[0052] azaGly；或

[0053] azaGly. Z；或

[0054] DAla. Z；或

[0055] Glu. Z；或

[0056] DAla-Glu. Z；或

[0057] DAla-DAla. Z；或

[0058]  $\beta$  Ala. Z；或

[0059] Pro；或

[0060] Pro. Z；或

[0061] DAla-Gly. Z；或

[0062] Gly. Z，

[0063] 其中 Z 是除去了 C 末端氨基酸残基上电荷的基团。

[0064] 优选地，Z 具有小于 200 的分子量，优选为小于 150，优选为小于 100。优选地，Z 是 NHR'，其中 R' 是 H 或 C<sub>1</sub> 至 C<sub>4</sub> 烷基或者 Z 是 OR"，其中 R" 是 C<sub>1</sub> 至 C<sub>4</sub> 烷基。优选地，Z 是酰胺。优选地，Z 是 NH<sub>2</sub> 或 N-丙胺或 N-乙胺 (NHEt) 或 N-甲胺或 N-丁胺。

[0065] Try/His 包括，在肽序列的位置 5 存在氨基酸酪氨酸 (Tyr) 或氨基酸组氨酸 (His)。

[0066] Leu/Trp 包括，在肽序列的位置 7 存在氨基酸亮氨酸 (Leu) 或氨基酸色氨酸 (Trp)。

[0067] 优选地，A 是 azaGly. NH<sub>2</sub>。

[0068] 优选地，A 是 DAla. NH<sub>2</sub> 或 Glu. NH<sub>2</sub>。

[0069] 优选地，A 是 DAla. NH<sub>2</sub> 或 Glu. NH<sub>2</sub>。

[0070] 优选地，A 是 DAla-Glu. NH<sub>2</sub> 或 DAla-DAla. NH<sub>2</sub> 或 DAla-Gly. NH<sub>2</sub>。

[0071] 优选地，A 是  $\beta$  Ala. NH<sub>2</sub>。

[0072] 优选地，A Pro. Z，其中 Z 选自 NH<sub>2</sub>、N-丙胺、N-乙胺、N-甲胺或 N-丁胺。

[0073] 优选地，本发明提供了试剂，其中 R4 选自丙氨酸、天冬酰胺、半胱氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、赖氨酸、亮氨酸、蛋氨酸、脯氨酸、谷氨酰胺、丝氨酸、色氨酸、缬氨酸、苏氨酸、酪氨酸。

[0074] 术语“氨基酸”包括任何同时具有与  $\alpha$ -碳原子结合的羧基 (-COOH) 和氨基 (-NH<sub>2</sub>) 基团的水溶性有机化合物的基团。氨基酸可由通式 R-CH(NH<sub>2</sub>)COOH 代表，其中 R 基团是氢

或有机基团,且决定了任何特定氨基酸的特性。关于  $\alpha$ -碳原子的四个不同基团的四面体排列使氨基酸具有光学的活性。两个光学镜像被称为 L-异构体和 D-异构体。通常,只有 L-氨基酸为蛋白质的组成物。优选地,本发明的第一个和第二个方面中的试剂的 GnRH 受体结合性部分由 L-氨基酸组成。

[0075] 在肽键形成的过程中,氨基酸组合在一起形成短链(肽)或长链(多肽)。众所周知,蛋白质由大约 20 种不同比例的常见的氨基酸组成。其序列决定了蛋白质的形状、特性和生物学作用。肽或多肽链中的氨基酸残基通常以其在链中的位置编号来表示,在链的 N 末端的氨基酸被编为第 1 个位置(即位置 1)。

[0076] 在第三个方面,本发明提供了包含以下肽序列或由以下肽序列组成的试剂在制备用于治疗增殖性失调的药物中的用途:pLGlu-LHis-LTrp-LSer-LHis-X-LTrp-LTyr-LPro-A,其中 X 是 D-氨基酸残基,且 A 选自:

[0077] Z;或

[0078] azaGly;或

[0079] azaGly. Z;或

[0080] DAla. Z;或

[0081] Glu. Z;或

[0082] DAla-Glu. Z;或

[0083] DAla-DAla. Z;或

[0084]  $\beta$  Ala. Z;或

[0085] Pro;或

[0086] Pro. Z;或

[0087] DAla-Gly. Z;或

[0088] Gly. Z,

[0089] 其中 Z 是除去了 C 末端氨基酸残基上电荷的基团。

[0090] 优选地,本发明提供了用途,其中 X 选自 D-精氨酸、D-赖氨酸、D-色氨酸、D-赖氨酸、D-酪氨酸、D-丙氨酸、D-丝氨酸。

[0091] 优选地, A 是 azaGly.  $\text{NH}_2$ 。

[0092] 优选地, A 是 DAla.  $\text{NH}_2$  或 Glu.  $\text{NH}_2$ 。

[0093] 优选地, A 是 DAla-Glu.  $\text{NH}_2$  或 DAla-DAla.  $\text{NH}_2$  或 DAla-Gly.  $\text{NH}_2$ 。

[0094] 优选地, A 是  $\beta$  Ala.  $\text{NH}_2$ 。

[0095] 优选地, A Pro. Z, 其中 Z 选自  $\text{NH}_2$ 、N-丙胺、N-乙胺、N-甲胺或 N-丁胺。

[0096] 在第四个方面,本发明提供了包含选自以下肽序列的试剂在制备用于治疗增殖性失调的药物中的用途:

[0097] i) pLGlu-LHis-LTrp-LSer-LHis-DArg-LTrp-LTyr-LPro-A;

[0098] ii) pLGlu-LHis-LTrp-LSer-LHis-DTrp-LTrp-LTyr-LPro-A;

[0099] iii) pLGlu-LHis-LTrp-LSer-LTyr-DLys-LTrp-LGln-LPro-A;

[0100] iv) pLGlu-LHis-LTrp-LSer-LTyr-DLys-LTrp-LLeu-LPro-A;

[0101] v) pLGlu-LHis-LTrp-LSer-LTyr-DLys-LTrp-LTyr-LPro-A;

[0102] v-B) pLGlu-LHis-LTrp-LSer-LTyr-DLys-LTrp-LArg-LPro-A;

- [0103] vi)pLGlu-LHis-LTrp-LSer-LTyr-DTrp-LTrp-LArg-LPro-A ;  
[0104] vii)pLGlu-LHis-LTrp-LSer-LHis-DLys-LTrp-LTyr-LPro-A ;  
[0105] viii)pLGlu-LHis-LTrp-LSer-LHis-DArg-LTrp-LTyr-LPro. Y ;  
[0106] ix)pLGlu-LHis-LTrp-LSer-LHis-DArg-LLeu-LArg-LPro-A ;  
[0107] x)pLGlu-LHis-LTrp-LSer-LHis-DTrp-LTrp-LArg-LPro-A ;  
[0108] xi)pLGlu-LHis-LTrp-LSer-LHis-DTrp-LLeu-LArg-LPro-A ;  
[0109] xii)pLGlu-LHis-LTrp-LSer-LHis-DTyr-LLeu-LArg-LPro-A ;  
[0110] xiii)pLGlu-LHis-LTrp-LSer-LHis-DAla-LTrp-LTyr-LPro-A ;  
[0111] xiv)pLGlu-LHis-LTrp-LSer-LHis-DSer-LTrp-LTyr-LPro-A,

[0112] 其中 Y 是 DAla. NH<sub>2</sub> 或 Z ;且 A 选自 :

[0113] Z ;或

[0114] azaGly ;或

[0115] azaGly. Z ;或

[0116] DAla. Z ;或

[0117] Glu. Z ;或

[0118] DAla-Glu. Z ;或

[0119] DAla-DAla. Z ;或

[0120] β Ala. Z ;或

[0121] Pro ;或

[0122] Pro. Z ;或

[0123] DAla-Gly. Z ;或

[0124] Gly. Z,

[0125] 其中 Z 是除去了 C 末端氨基酸残基上电荷的基团。

[0126] 优选地, Z 具有小于 200 的分子量, 优选为小于 150, 优选为小于 100。优选地, Z 是 NHR', 其中 R' 是 H 或 C<sub>1</sub> 至 C<sub>4</sub> 烷基或者 Z 是 OR", 其中 R" 是 C<sub>1</sub> 至 C<sub>4</sub> 烷基。优选地, Z 是酰胺。优选地, Z 是 NH<sub>2</sub> 或 N- 丙胺或 N- 乙胺 (NHEt) 或 N- 甲胺或 N- 丁胺。

[0127] 优选地, A 是 azaGly. NH<sub>2</sub>。

[0128] 优选地, A 是 DAla. NH<sub>2</sub> 或 Glu. NH<sub>2</sub>。

[0129] 优选地, A 是 DAla-Glu. NH<sub>2</sub> 或 DAla-DAla. NH<sub>2</sub> 或 DAla-Gly. NH<sub>2</sub>。

[0130] 优选地, A 是 β Ala. NH<sub>2</sub>。

[0131] 优选地, A 是 Pro. Z, 其中 Z 选自 NH<sub>2</sub>、N- 丙胺、N- 乙胺、N- 甲胺或 N- 丁胺。

[0132] 以上所列肽 (viii) 的一个具体实施方式在序列的位置 9 包含氨基酸残基 Pro. NHEt, 其中缩写代表经过在 C 末端加入 N- 乙胺修饰的脯氨酸。

[0133] 优选对肽 (viii) 来说 Y 是 NHEt。本发明人发现在肽中 Pro. NHEt 的存在导致抗增殖活性的增加。

[0134] 优选地, 本发明的第三和第四个方面所述的试剂由 L- 氨基酸组成, 在位置 6 有 D 氨基酸。

[0135] 本发明的试剂包括 GnRH I 和 / 或 GnRH II 肽的氨基酸序列的经修饰的版本。本发明的试剂的肽序列可通过固相肽合成的 Fmoc- 聚酰胺模式来合成, 如 Lu 等人 (1981) J. Org.

Chem. 46, 3433 和这里的参考文献所描述。临时性 N-氨基保护通过 9- 芴甲氧羰基 (Fmoc) 基团来提供。使用 N,N- 二甲基中的 20% 哌啶对这个高度碱敏感的保护性基团进行重复切割。侧链官能团可作为其丁醚 (在丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸的情况下)、丁酯 (在谷氨酸和天冬氨酸的情况下)、丁氧基羰基衍生物 (在赖氨酸和组氨酸的情况下)、三苯甲游基衍生物 (在半胱氨酸的情况下) 和 4- 甲氧基 -2,3,6- 三甲基苯磺酰基衍生物 (在精氨酸的情况下) 来进行保护。当谷氨酰胺或天冬酰胺为 C 末端残基时, 使用 4,4'- 二甲氧基二苯甲基基团进行侧链官能团的保护。固相支持物是基于聚二甲基丙烯酸酯聚合物, 该聚合物由三个单体所组成, 即二甲基丙烯酸酯 (骨架单体)、双丙烯酰乙烯 (交联体) 和丙烯酰肌氨酸甲酯 (官能化试剂)。所用的肽至树脂可切割相连试剂为酸敏感的 4- 羟基甲基 - 苯氧基乙酸衍生物。除了天冬酰胺和谷氨酰胺 (使用逆 N,N- 二环己基 - 碳二亚胺 /1- 羟基苯并三唑介导的偶联程序进行添加) 之外, 所有的氨基酸衍生物作为其预先进行的对称的酞衍生物进行添加。所有的偶联和去保护反应以茚三酮、三硝基苯磺酸或同中子异荷素 (isotin) 测试程序进行监视。合成完成之后, 通过用含有 50% 净化剂的 95% 的三氟乙酸处理把肽从树脂支持物上切割下来 (同时伴随除去侧链保护基团)。通常使用的净化剂为乙基二硫醇、苯酚、苯甲醚和水, 提取选择取决于所合成肽的组成氨基酸。在真空中通过蒸发除去三氟乙酸, 然后用二乙醚进行研碎形成粗肽。通过简单的提取程序 (冻干水相) 来除去任何的净化剂, 使粗肽不含净化剂。用于肽合成的试剂通常可由 Calbiochem-Novabiochem(UK) Ltd, Nottingham NG7 2QJ, UK 获得。纯化可通过任何一个技术或其组合例如体积排阻色谱、离子交换色谱和 (主要的) 反相高压液相色谱来进行。可通过薄层色谱、反相高压液相色谱、酸性水解后氨基酸分析和快原子轰击 (FAB) 质谱分析来对肽进行分析。

[0136] 本发明试剂的肽序列也可使用液相方法进行合成, 如化学和生物化学领域普通技术人员所知。

[0137] 本发明试剂的肽序列可包含或由仿肽 (peptidomimetic) 化合物组成。术语“仿肽”是指模拟作为治疗性试剂的特别肽的构象和所需特征的化合物, 但是可避免不需要的特征。例如, 吗啡是可经口服使用的化合物, 是肽内啡肽 (endorphin) 的仿肽。

[0138] 通常, 由于缺少口服生物可利用率和蛋白水解降解, 与肽相关的治疗性应用受到限制。通常, 例如, 在体内肽迅速被外肽酶和内肽酶所降解, 导致通常很短的生物学半衰期。作为潜在的治疗性试剂的肽的另一个缺陷是它们缺少口服生物可利用率。在胃肠道中蛋白水解酶对肽的降解可能是一个重要的形成因素。但是, 由于已认识到即使是小的环肽 (其不会被快速代谢失活) 却也表现出较差的口服生物可利用率, 这使得问题更加复杂。这可能是由于较差的跨肠道膜转运以及通过肝提取而从血液中快速清除然后分泌至肠。这些观察暗示: 多个酰胺键可干扰口服生物可利用率。认为: 当肽药物经口服使用时, 连接肽中氨基酸残基的肽键可能断裂分开。

[0139] 设计和合成仿肽有一些不同的方法。在一个方法中, 例如由 Sherman 和 Spatola, J. Am. Chem. Soc., 112:433 (1990) 所披露的, 一个或一个以上的酰胺键以实质上等排的方式被各种化学官能基团所替代。这种楼梯式方法已取得一些成功: 已经获得活性类似物。在一些情况下表明: 这些类似物具有相对于其天然产生的同类物较长的生物学半衰期。但是, 这个方法有局限性。很少能实现对一个以上的酰胺键的替换。所以, 产生的类似物在分子的其他位置仍然容易对酶失活。当替代肽键时, 优选为新的连接部分具有与肽键相同的

电荷分布和实质上相同的平面性。

[0140] 逆反仿肽（其中肽键是反的）可通过本领域已知的方法来合成，例如在 Méziere 等人 (1997) *J. Immunol.* 159:3230-3237 中所描述的。这个方法包括产生含有变化的假肽，该变化包括骨架但不包括侧链的方向。逆反肽（其含有 NH-CO 键而不是 CO-NH 肽键）对于蛋白质水解有更高的抗性。以前曾经合成了一些 GnRH 肽的逆反仿肽 (Fromme, 2003, *Endocrinology*, 144 :3262-9)。

[0141] 在另一个方法中，使用了各种未编码或经修饰的氨基酸例如 D-氨基酸和 N-甲基氨基酸来对哺乳动物肽进行修饰。或者，假定为生物活性的构象通过共价修饰（例如环化或通过引入  $\gamma$ -内酰胺或其他类型的桥）进行稳定。参见，例如 Veber 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75 :2636 (1978) 和 Thursell 等人, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 111 :166 (1983)。

[0142] 众多合成策略中的一个常见主题为将一些环形部分引入基于肽的框架。环形部分限制了肽结构的构象空间，这经常引起肽对特定的生物学受体的增高的亲和力。这个策略的另一个附加好处为将环形部分引入肽也可形成对细胞肽酶具有减少的敏感性的肽。

[0143] 一个合成环形稳定化仿肽的方法为关环复分解 (ring closing metathesis, RCM)。这个方法包括以下步骤：合成肽前体并将其与 RCM 催化剂相接触以产生构象限制性肽。合适的肽前体可含有两个或两个以上未饱和 C-C 键。该方法可使用固相肽合成技术来进行。在这个具体实施方式中，将前体（其被锚定于固体支持物）与 RCM 催化剂相接触，然后从固体支持物上切割产物以产生构象限制性肽。

[0144] 另一个由 D.H. Rich 在 *Protease Inhibitors*, Barrett and Selveson, eds., Elsevier (1986) 所披露的方法通过应用酶抑制剂设计中的转换态类似物概念来涉及肽模拟物。例如，已知 staline 的仲醇模拟胃蛋白酶底物的易断裂酰胺键的四面体转换态。但是，转换态类似物概念与激素激动剂 / 拮抗剂设计无明显关联。

[0145] 为了避免疑虑，没有必要将肽序列中的氨基酸残基用标准肽键连接。例如，如上所讨论，氨基酸残基可通过逆反肽键来连接，或者可通过其他键（模拟标准肽键的键距和空间方向）来连接起来。

[0146] 本发明的试剂的肽序列可使用本领域已知的方法例如 HPLC 和色谱来合成然后纯化。

[0147] 在第五个方面，本发明提供了如本发明第三个或第四个方面所定义的试剂用于药物的用途。因此，试剂可被包装和呈现为药物用途。

[0148] 在第六个方面，本发明提供了根据本发明第一个或第二个方面所述试剂在制备用于治疗增殖性失调的药物中的用途。

[0149] “增殖性失调”包括任何关于以不适宜速率和 / 或在个体的机体中不适宜位置的细胞增殖和 / 或生长的病状，例如：癌症、生殖性癌症、良性前列腺增生、子宫内膜异位、子宫纤维化。

[0150] 应该认识到：由于本发明的试剂能够引起程序性细胞死亡（即细胞凋亡）和细胞周期停滞，该试剂可用于防止和 / 或减少细胞增殖，从而可用于治疗任何有关不适宜细胞增殖和 / 或生长的病状。

[0151] 优选地，增殖性失调为动物的癌症，更优选地，癌症为生殖性癌症。

[0152] 优选地,动物为人类,但是可以是任何哺乳动物例如家养哺乳动物(优选为具有农业上或商业上重要性的,包括鸡、猫、狗、猪、绵羊、母牛、马)。

[0153] 更优选地,癌症选自妇科癌症、前列腺癌、良性前列腺增生、子宫内膜癌、子宫颈癌、卵巢癌、乳癌、黑素瘤、胰腺癌、胃癌。在本发明的这个方面的特别优选的具体实施方式中,癌症为前列腺癌或良性前列腺增生。

[0154] 所有表达 GnRH 受体的癌症均可使用本发明的试剂进行潜在地治疗。优选地,癌症为生殖性癌症(包括前列腺、子宫内膜、子宫颈、卵巢和乳癌),这些均表达 GnRH 受体。其他的表明表达 GnRH 受体的癌症包括黑素瘤、胰腺癌和胃癌,除别的以外。优选地,癌症选自:妇科癌症、前列腺癌、良性前列腺增生、子宫内膜癌、子宫颈癌、卵巢癌、乳癌、黑素瘤、胰腺癌、胃癌。

[0155] 可在不表达 GnRH 受体的细胞中诱导 GnRH 受体的表达和/或在表达 GnRH 受体的细胞中(其表达水平太低以致于不能使用本发明的试剂用于治疗)增加 GnRH 受体的表达。一旦在一个或一个以上细胞中将 GnRH 受体的水平诱导和/或增加至适合于使用本发明的试剂进行治疗的水平,则可使用本发明的试剂对一个或一个以上细胞进行治疗。

[0156] 诱导细胞中基因表达的方法在本领域是熟知的。例如,可通过激活一个或一个以上对转录启动子(其对控制细胞中基因组拷贝的 GnRH 基因的表达有作用)或其元件来诱导细胞中 GnRH 受体的表达。或者,可使用本领域已知的方法将包含编码 GnRH 受体序列(具有或没有能够知道 GnRH 受体表达的转录和翻译元件)的聚核苷酸分子(例如 cDNA 或载体)引入细胞中并在其中进行表达。例如,可通过将聚核苷酸分子偶联至配体(配体能够与靶细胞上或靶细胞中表达的受体相结合)把聚核苷酸分子引入靶细胞(例如癌细胞)。例如,可将聚核苷酸分子通过聚赖氨酸结合而偶联至 EGF 配体从而把聚核苷酸分子引入表达 EGF(内皮细胞生长因子)的一些癌细胞。或者,可使用本领域技术人员熟知的方法通过病毒载体(例如腺病毒)将聚核苷酸分子引入细胞。

[0157] 检测细胞蛋白表达的方法在本领域是熟知的。适合于检测 GnRH 受体表达的方法包括:原位杂交和/或 PCR 以检测编码 GnRH 受体的 mRNA 的存在、放射性配体结合以检测 GnRH 受体蛋白的存在和有关能够特异性地与 GnRH 受体结合的抗体的方法(例如,免疫杂交、免疫组化、免疫荧光和 ELISA)。

[0158] 在第七个方面,本发明提供了防止和/或减少一个或一个以上细胞增殖的方法,该方法包括将有效量的根据本发明第一个或第二个或第三个或第四个方面所述试剂与一个或一个以上细胞结合。

[0159] “有效量”包括足以减少一个或一个以上细胞(例如癌细胞)增殖的本发明的试剂的数量。可在体外通过使用在实施例中所描述的方法来确定有效量(例如,用于监测细胞存活率、胸苷摄入、磷脂酰肌醇积累和配体结合亲和力的方法)。

[0160] 优选地,细胞为人类或动物体的细胞。更优选地,动物是任何哺乳动物例如家养哺乳动物(优选为具有农业上或商业上重要性的,包括鸡、猫、狗、猪、绵羊、母牛、马)。

[0161] 在第八个方面,本发明提供了包含选自如下肽序列的试剂:

[0162] w) pLGlu-LHis-LTrp-LSer-LHis-DArg-LTrp-LTyr-LPro. Y ;

[0163] x) pLGlu-LHis-LTrp-LSer-LHis-DArg-LTrp-LTyr-LPro-A ;

[0164] y) pLGlu-LHis-LTrp-LSer-LHis-DArg-LLeu-LArg-LPro-A ;

[0165] z)pLGlu-LHis-LTrp-LSer-LHis-DSer-LTrp-LTyr-LPro-A ;

[0166] 其中, Y 是 DAla. NH<sub>2</sub> 或 Z ;且 A 选自 :

[0167] Z ;或

[0168] azaGly ;或

[0169] azaGly. Z ;或

[0170] DAla. Z ;或

[0171] Glu. Z ;或

[0172] DAla-Glu. Z ;或

[0173] DAla-DAla. Z ;或

[0174] β Ala. Z ;或

[0175] Pro ;或

[0176] Pro. Z ;或

[0177] DAla-Gly. Z ;或

[0178] Gly. Z,

[0179] 其中 Z 是除去了 C 末端氨基酸残基上电荷的基团。

[0180] 优选地, Z 具有小于 200 的分子量, 优选为小于 150, 优选为小于 100。优选地, Z 是 NHR', 其中 R' 是 H 或 C<sub>1</sub> 至 C<sub>4</sub> 烷基或者 Z 是 OR", 其中 R" 是 C<sub>1</sub> 至 C<sub>4</sub> 烷基。优选地, Z 是酰胺。优选地, Z 是 NH<sub>2</sub> 或 N- 丙胺或 N- 乙胺 (NHEt) 或 N- 甲胺或 N- 丁胺。

[0181] 优选地, A 是 azaGly. NH<sub>2</sub>。

[0182] 优选地, A 是 DAla. NH<sub>2</sub> 或 Glu. NH<sub>2</sub>。

[0183] 优选地, A 是 DAla-Glu. NH<sub>2</sub> 或 DAla-DAla. NH<sub>2</sub> 或 DAla-Gly. NH<sub>2</sub>。

[0184] 优选地, A 是 β Ala. NH<sub>2</sub>。

[0185] 优选地, A Pro. Z, 其中 Z 选自 NH<sub>2</sub>、N- 丙胺、N- 乙胺、N- 甲胺或 N- 丁胺。

[0186] 在第九个方面, 本发明提供了药物组合物, 其包含治疗上有效量的根据本发明第八个方面所述的试剂和药学上可接受的载体。

[0187] “治疗上有效量”包括足以防止和 / 或减少待治疗细胞 (例如癌细胞) 增殖的本发明的试剂的数量。可在体外通过使用在附随的实施例中所描述的方法来确定有效量 (例如, 用于监测细胞存活率、胸苷摄入、磷脂酰肌醇积累和配体结合亲和力的方法)。“治疗性效应”是指任何减轻和 / 或预防个体中与疾病相关的病状、疾病或病状的效应。用于确定本发明所述试剂、组合物或药物的治疗性效应的合适的检测对于医药相关领域技术人员来说是已知的。

[0188] “药学上可接受的”包括制剂为无菌的和无热原的。合适的药学载体在药剂学领域是熟知的。载体必须是“可接受的”, 即与本发明的试剂相兼容且对其接受者无害。通常, 载体是水或盐 (无菌的和无热原的), 但是, 也可使用其他的可接受的载体。

[0189] 本发明所述试剂、药物和药物组合物可使用注射的缓释药物输送系统进行输送。这些经特异设计以减少注射频率。这样的系统的例子为 Nutropin Depot, 其将重组人类生长激素 (rhGH) 以生物可降解微小球形成胶囊, 一旦注射, 可在一段持续时期内缓慢释放 rhGH。

[0190] 本发明所述试剂、药物和药物组合物可通过外科手术植入的设备 (其直接将药物

释放到所需位置)来使用。例如, Vitrasert 将更昔洛韦 (GANCICLOVIR) 直接释放到眼睛以治疗 CMV 视网膜炎。将这个毒性试剂直接应用到疾病位置可达到有效的治疗而没有药物的显著性的全身副作用。

[0191] 也可使用电穿孔治疗 (electroporation therapy, EPT) 系统来使用本发明所述试剂、药物和药物组合物。向细胞传输脉冲电场的设备增加了细胞膜对药物的通透性, 产生显著性增强的细胞内药物输送。

[0192] 也可通过电引入 (electroincorporation, EI) 来输送本发明所述试剂、药物和药物组合物。当皮肤表面的直径达到 30 微米的小颗粒经历与电穿孔中相同或相似的电脉冲时会发生 EI。在 EI 中, 这些颗粒被驱使穿过角质层而到达皮肤的更深层。可以药物或基因对颗粒进行装载或包被, 或者可简单地作为“子弹”, 子弹在皮肤上产生孔, 药物可进入孔。

[0193] 输送本发明所述试剂、药物和药物组合物的替代方法为热敏感的 ReGel 注射系统。在体温以下, ReGel 是可注射液体, 而在体温时, 它立即形成凝胶库, 缓慢消蚀并溶解入已知的、安全的、生物可降解的聚合物。当生物聚合物溶解时活性物质随时间而被输送。

[0194] 本发明所述试剂、药物和药物组合物可经口服输送。过程采用体内维生素 B<sub>12</sub> 口服摄取系统来共传输蛋白和肽。通过采用维生素 B<sub>12</sub> 摄取系统, 本发明所述核酸、分子和药物组合物可穿过肠壁。在维生素 B<sub>12</sub> 类似物和药物之间合成了复合体, 该复合体保留了对复合体的维生素 B<sub>12</sub> 部分中的内在因子 (intrinsic factor, IF) 的显著性亲和力, 同时保留了复合体的活性物质的显著性生物活性。

[0195] 本发明所述试剂、药物和药物组合物可通过“特洛伊肽 (Trojan peptide)”引入到细胞中。有一类被称为 penetratins 的多肽, 其具有转移特性, 能够携带亲水性化合物穿过细胞膜。这个系统允许直接将寡聚肽靶向细胞质和细胞核, 可以是非细胞类型特异性的和高效的。参见 Derossi 等人 (1998), Trends Cell Biol 8, 84-87。

[0196] 优选地, 本发明所述药物和 / 或药物组合物为单位剂量, 其含有日剂量或单位、日亚剂量或其合适部分的活性成分。

[0197] 本发明所述试剂、药物和药物组合物通常通过口服或任何非肠道途径以药物组合物 (包含药学上可接受的剂型的活性物质, 任选的为非毒性的有机或无机酸或碱、加成盐的形式) 的形式来使用。组合物可以不同的剂量使用, 取决于顺序以及待治疗的病人, 以及施药途径。

[0198] 在人类治疗中, 本发明所述试剂、药物和药物组合物可单独使用, 但通常是与合适的药学赋形剂、稀释剂或载体 (根据想要的施药途径和标准药学实践来进行选择) 混合使用。

[0199] 例如, 本发明所述试剂、药物和药物组合物可以药片、胶囊、胚珠、酞剂、溶液或悬浮液的形式 (可包含芳香剂或着色剂) 经口、口腔或舌下使用, 用于立即、迟缓或经控制的释放应用。也可通过海绵体注射 (intracavernosal injection) 来使用本发明所述试剂、药物和药物组合物。

[0200] 合适的药片可含有赋形剂例如微晶纤维素、乳糖、柠檬酸钠、碳酸钙、磷酸氢钙和甘氨酸, 崩解剂例如淀粉 (优选为玉米、马铃薯或木薯淀粉)、羟基乙酸淀粉钠、交联羧甲基纤维素钠 (Croscarmellose Sodium) 和一些复合硅酸盐, 以及成粒黏合剂例如聚乙烯吡咯烷酮、羟基丙基甲基纤维素 (HPMC)、羟基-丙基纤维素 (HPC)、蔗糖、凝胶和阿拉伯树胶。另外,

可包括润滑剂例如硬脂酸锰、硬脂酸、山萘酸甘油酯和云母。

[0201] 也可在凝胶胶囊中使用相似类型的固体组合物作为填充物。在这个方面优选的赋形剂包括乳糖、淀粉、纤维素、牛奶糖或高分子量的聚乙二醇。对于水性悬浮液和 / 或酞剂来说,本发明的试剂可与下列相组合:各种甜味剂或芳香剂,着色物或染料,乳化剂和 / 或悬浮剂以及稀释剂例如水、乙醇、聚乙二醇和甘油或其组合。

[0202] 本发明所述试剂、药物和药物组合物也可经非肠道使用,例如,静脉内、动脉内、腹膜内、鞘内、心室内、胸骨内、头颅内、肌肉内或皮下,或者他们可通过浸剂技术使用。最好以无菌水性溶液的形式来使用,无菌水性溶液可包括其他物质,例如,足够的盐或葡萄糖以使该溶液与血液等压。如果必要,水性溶液应该经过合适地缓冲(优选为至 pH 为 3 至 9)。在无菌条件下制备合适的非肠道制剂可通过本领域技术人员熟知的标准药学技术容易地实现。

[0203] 适合于非肠道使用的药物和药学组合物包括水性和非水性无菌注射溶液(可包含抗氧化物、缓冲剂、抑菌剂和溶质,这使得制剂与预期的接受者的血液等压),和水性和非水性无菌悬浮液(可包含悬浮剂和增厚剂)。药物和药物组合物可以单位剂量或多剂量容器的形式呈现,例如密封的安瓿和小瓶,可贮存于冻干(冻干, lyophilised)的条件下,只需要在使用瞬前加入无菌液体载体,例如用于注射的水)。临时注射溶液和悬浮液可从以前描述的类型的不菌粉末、颗粒和药片来制备。

[0204] 对于人类病人口服和非肠道使用,本发明所述试剂、药物和药物组合物的日剂量水平通常为每个成人  $10 \mu\text{g}$  至  $500\text{mg}$ (即大约  $0.1 \mu\text{g}$  至  $5\text{mg}/\text{kg}$ ,假设成人为  $100\text{kg}$ ),以单独或分开的剂量使用。

[0205] 因此,例如,本发明所述试剂的药片或胶囊可含有合适剂量的活性试剂以单独施药或每次施药两次或两次以上(作为合适的)。在任何情况下临床医生将确定什么剂量的试剂对任何个体病人是最合适的,这将根据特定病人的年龄、体重和反应而变化。上述剂量是一般情况下的示例性剂量。当然会有这样的实例:高或低剂量范围是有益的,这落在本发明的范围之内。

[0206] 本发明所述试剂、药物和药物组合物也可经鼻内或通过吸入使用,可以干粉吸入器或气雾剂喷雾器(来自加压的容器、泵、喷雾器或雾化器,使用合适的推进剂,例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、羟基氟烷烃例如 1,1,1,2-四氟乙烷(HFA 134A3 或 1,1,1,2,3,3,3-七氟丙烷(HFA227EA3))、二氧化碳或其他合适的气体)的形式方便的输送。在加压气雾剂的情况下,剂量单元可通过提供阀来确定以输送计量的数量。加压的容器、泵、喷雾器或雾化器可含有活性试剂的溶液或悬浮液,例如使用乙醇和作为溶剂的推进剂的混合物,还可含有润滑剂例如失水山梨醇三油酸酯(sorbitan trioleate)。用于吸入器或吹入器的胶囊和弹药筒(从例如凝胶制备而来)可制成含有本发明所述试剂和合适的粉末基底例如乳糖或淀粉的粉末混合物。

[0207] 优选为将气雾剂或干粉制剂安排成每个计量的剂量或“一阵喷烟”含有合适数量的本发明所述试剂以输送于病人。可以认识到:气雾剂的每日总剂量将在病人之间变化,可以单独剂量或更通常为以一天之中分开的剂量来使用。临床医生将决定精确的剂量。剂量可与用于药物布舍瑞林(Buserelin)或布舍瑞林乙酸盐(合成的 GnRH 类似物,用于治疗前列腺癌和 / 或良性前列腺增生)的剂量(如本领域技术人员所知)类似。

[0208] 或者,本发明所述试剂、药物和药物组合物可以栓剂或子宫托的形式使用,或者他们可以洗剂、溶液、面霜、药膏或隔离剂的形式在局部应用。本发明所述试剂、药物和药物组合物也可经皮肤使用,例如,通过使用透皮贴剂。他们也可通过眼睛途径使用,特别是用于治疗眼睛疾病。

[0209] 对于眼科用途,本发明所述试剂、药物和药物组合物可被制成等压的、pH 经调节的无菌的盐的微粉化悬浮液,或优选地,制成等压的、pH 经调节的无菌的盐的溶液,任选为与防腐剂例如氯化苯二甲烃铵 (Benzalkonium Chloride)。或者,他们可制成药膏例如凡士林 (petrolatum)。

[0210] 对于局部应用到皮肤,本发明所述试剂、药物和药物组合物可被制成合适的含有活性试剂药膏,活性试剂悬浮于或溶解于例如以下一个或一个以上物质的混合物:矿物油、液体凡士林、白凡士林、丙二醇、聚氧乙烯聚氧丙烯试剂、乳化蜡和水。或者,它们可被制成合适的洗剂或面霜,悬浮于或溶解于例如以下一个或一个以上物质的混合物:矿物油、山梨醇酐单硬脂酸酯 (sorbitan monostearate)、聚乙二醇、液体石蜡、聚山梨醇酯 60、十六醇酯蜡 (cetyl ester wax)、鲸蜡硬脂醇 (cetearyl alcohol)、2-辛基十二醇 (2-octyldodecanol)、苯甲基醇和水。

[0211] 适合于在口中局部使用的制剂包括锭剂 (lozenge),其包含在香味基底(通常为蔗糖和阿拉伯树胶或黄芪胶)中的活性成分;锭剂 (pastille),其包含在惰性基底(例如凝胶和甘油,或蔗糖和阿拉伯树胶)中的活性成分;以及漱口剂 (mouth-wash),其包含在合适的液体载体中的活性成分。

[0212] 通常,在人类中,本发明所述试剂、药物和药物组合物优选为通过口服或非肠道使用,这最为方便。

[0213] 对于兽医上的应用,本发明所述试剂、药物和药物组合物根据通常兽医实践作为合适的可接受的制剂来使用,且兽医外科医生将确定对特定动物来说最合适的剂量制度和施药途径。

[0214] 便利地,制剂为药制剂。

[0215] 有利地,制剂为兽医制剂。

[0216] 在第十个方面,本发明提供了治疗癌症的方法,方法包含或由下列组成:向有需要的个体使用有效量的根据本发明第一个和/或第二个和/或第三个和/或第四个方面所述试剂和/或根据本发明第八个方面所述药物组合物。

[0217] 有利地,本发明所述试剂可靶向肿瘤和/或癌细胞和/或直接向肿瘤和/或癌细胞使用。在一个特别优选的具体实施方式中,癌症为前列腺癌或良性前列腺增生。

[0218] 在第十一个方面,本发明提供了治疗增殖性失调的方法,方法包含或由下列组成:向有需要的个体使用有效量的根据本发明第一个和/或第二个和/或第三个和/或第四个方面所述试剂和/或根据本发明第八个方面所述药物组合物。

[0219] 优选地,治疗增殖性失调的方法被用户化或裁制成适合于特定个体和将被负责治疗医生来治疗的失调症。但是,本发明所述试剂的有利之处在于它们实质上表现出无副作用(如果有一些的话),因此允许使用普通方法来治疗一系列增殖性失调。

[0220] 在第十二个方面,本发明提供了鉴定具有一个或以上对于使用本发明第一个和/或第二个和/或第三个和/或第四个方面所述试剂和/或根据本发明第八个方面所述药物

组合物进行的治疗具有潜在易感性的细胞的个体的方法,该方法包含或由以下步骤组成:

[0221] a) 提供来自待测个体的样品,样品包含一个或一个以上细胞;

[0222] b) 将样品与本发明第一个和/或第二个和/或第三个和/或第四个方面所述试剂和/或根据本发明第八个方面所述药物组合物相组合;

[0223] c) 确定一个或一个以上细胞的增殖水平;

[0224] d) 在试剂和/或药物组合物防止和/或减少一个或以上细胞增殖的情况下,鉴定具有一个或以上对于治疗具有潜在易感性的细胞的个体。

[0225] 优选地,细胞为癌细胞。

[0226] 分子和细胞生物学相关领域技术人员应该明白:本发明所述试剂可被用于鉴定对于使用如此处定义的试剂和/或如此处定义的药物组合物进行的治疗具有潜在易感性的细胞(例如癌细胞)。例如,本发明所述试剂(与本发明所述方法和在随附实施例中所述的方法相一致)可被用作诊断性反应剂以检测在一个测试样品中在一个或一个以上细胞(例如癌细胞)中是否存在一个或一个以上 GnRH 受体,并监测一个或一个以上细胞的增殖是否被本发明所述试剂所防止和/或减少。对本领域技术人员来说清楚的是:鉴定在一个或一个以上细胞中是否存在一个或一个以上 GnRH 受体和对一个或一个以上细胞增殖的防止和/或减少可用来指征这样的细胞将对于使用本发明所述试剂和/或药物和/或药物组合物进行的治疗具有易感性。

[0227] 从待测个体中获得包含一个或一个以上细胞(例如癌细胞)的样品的方法对医药和外科领域技术人员来说是熟知的。例如,可通过取得组织或器官的活组织检查或通过吸取液体材料(例如血液、淋巴或腹膜液)来获得。这样的方法用于例如筛选乳癌和卵巢癌个体。

[0228] 在第十三个方面,本发明提供了产生根据本发明第一个和/或第二个和/或第三个和/或第四个方面所述试剂的方法,该方法包括或由化学合成肽序列的步骤组成。合成如此处定义的试剂的方法包括如上所述的那些。

[0229] 优选地,将通过提及以下图示来描述包括本发明的一些方面的非限定性实施例。

[0230] 图 1:

[0231] A. 表达 GnRHR 的四个不同的 HEK293 细胞系(具有或缺少 C 末端尾巴)和野生型细胞经过 GnRH I 持续处理 5 天之后,GnRH I 对细胞数目的效应。在台盼蓝温育之后,使用血球计对活细胞进行计数。每条曲线为至少三个单独实验的和,其中每个点以三次重复进行确定,显示了 S. E. M 作为误差条。以未经处理的细胞数目对数值进行标准化(hGnRHR:人类 GnRHR;hGnRHR/cfGnRHR:带有鲛鱼 GnRHR 尾巴的人类 GnRHR;rGnRHR:大鼠 GnRHR;rGnRHR/TRHR:带有大鼠 TRHR 尾巴的大鼠 GnRHR)。注意:在除了 GnRHR 受体之外的所有的 GPCR 中存在的加入的细胞内尾巴消除了 GnRH I 的抗增殖效应。

[0232] B. 在两个表达 rGnRHR(左边)或 rGnRHR/TRHR(右边)的 HEK293 细胞系中由 100nM 的 GnRH I 引起的 ERK 的激活图谱。条带显示了在代表性 western 杂交中使用特异性抗-磷酸化 ERK1/2 抗体在全细胞裂解物中获得的信号。每个柱状图中的条形代表从至少两个独立实验获得的结合数据,S. E. M 作为误差条显示。以每个数据系列中的最大的 ERK 激活对数值进行标准化。

[0233] 图 2:

[0234] A. 暴露于 100nM 的 GnRH I 或 GnRH II 的 HEK293/rGnRHR 细胞中胸苷摄入的时间过程。对照细胞未经处理。所显示的图标为至少两个单独实验的代表,其中每个点代表三次重复的平均值,S. E. M 作为误差条显示。以最大的胸苷摄入对计数进行标准化。

[0235] B. 暴露于 100nM 的 GnRH I (左边) 或 GnRH II (右边) 的 HEK293/rGnRHR 细胞中 PARP (细胞调亡的标志) 切割的时间过程。条带显示了在代表性 western 杂交中使用特异性抗 - 经切割 PARP 抗体在全细胞裂解物中获得的信号。所显示的数据为至少两个独立实验的代表。

[0236] 图 3 :

[0237] 在 HEK293/rGnRHR 细胞中由 GnRH I (A) 或 GnRH II (B) 所诱导的对 PARP 切割的抑制。在完全细胞培养液中以 100nM 的激动剂和不同的化学抑制剂 (对于个体的浓度参见方法部分) 对细胞进行共处理 48 小时。然后,制备粗细胞裂解提取物,用特异性的抗 - 经切割 PARP 抗血清免疫杂交确定 PARP 的切割。柱状图中的每个条形代表从至少三个独立实验获得的结合数据,S. E. M 作为误差条显示。

[0238] 图 4 :

[0239] A. HEK293/rGnRHR 细胞中 GnRH I 和 GnRH II 的竞争性结合曲线。曲线代表至少三个独立实验中的一个,其中每个点代表三次重复的平均值,S. E. M 作为误差条显示。以每个数据系列中最大的特异性结合对计数进行标准化。

[0240] B. HEK293/rGnRHR 细胞中 GnRH 类似物的竞争性结合曲线。曲线代表至少三个独立实验中的一个,其中每个点代表三次重复的平均值,S. E. M 作为误差条显示。以每个数据系列中最大的特异性结合对计数进行标准化。

[0241] 图 5 :

[0242] A. HEK293/rGnRHR 细胞中 GnRH I 和 GnRH II 的总磷酸肌醇积累曲线。曲线代表至少三个独立实验中的一个,其中每个点代表三次重复的平均值,S. E. M 作为误差条显示。以每个数据系列中最大反应对计数进行标准化。

[0243] B. HEK293/rGnRHR 细胞中 GnRH 类似物的总磷酸肌醇积累曲线。曲线代表至少三个独立实验中的一个,其中每个点代表三次重复的平均值,S. E. M 作为误差条显示。以每个数据系列中最大反应对计数进行标准化。

[0244] 图 6 :

[0245] A. HEK293/rGnRHR 细胞中 GnRH I 和 GnRH II 的抗增殖曲线。细胞以激动剂持续处理 5 天,然后在台盼蓝温育之后,使用血球计对活细胞进行计数。曲线代表至少三个独立实验中的一个,其中每个点代表三次重复的平均值,S. E. M 作为误差条显示。以未经处理的细胞数目对数值进行标准化。

[0246] B. HEK293/rGnRHR 细胞中 GnRH 类似物的抗增殖曲线。细胞以激动剂持续处理 5 天,然后在台盼蓝温育之后,使用血球计对活细胞进行计数。曲线代表至少三个独立实验中的一个,其中每个点代表三次重复的平均值,S. E. M 作为误差条显示。以未经处理的细胞数目对数值进行标准化。

[0247] 图 7 :

[0248] A. HEK293/hGnRHR 细胞中 GnRH I 和 GnRH II 的总磷酸肌醇积累曲线。曲线代表至少三个独立实验中的一个,其中每个点代表三次重复的平均值,S. E. M 作为误差条显示。以

每个数据系列中最大反应对计数进行标准化。

[0249] B. HEK293/hGnRHR 细胞中 GnRH 类似物的总磷酸肌醇积累曲线。曲线代表至少三个独立实验中的一个,其中每个点代表三次重复的平均值,S. E. M 作为误差条显示。以每个数据系列中最大反应对计数进行标准化。

[0250] 图 8 :

[0251] A. HEK293/hGnRHR 细胞中 GnRH I 和 GnRH II 的抗增殖曲线。细胞以激动剂持续处理 5 天,然后在台盼蓝温育之后,使用血球计对活细胞进行计数。曲线代表至少三个独立实验中的一个,其中每个点代表三次重复的平均值,S. E. M 作为误差条显示。以未经处理的细胞数目对数值进行标准化。

[0252] B. HEK293/hGnRHR 细胞中 GnRH 类似物的抗增殖曲线。细胞以激动剂持续处理 5 天,然后在台盼蓝温育之后,使用血球计对活细胞进行计数。曲线代表至少三个独立实验中的一个,其中每个点代表三次重复的平均值,S. E. M 作为误差条显示。以未经处理的细胞数目对数值进行标准化。

[0253] 表 1 :HEK293/rGnRHR 细胞中天然的和突变的 GnRH 肽的 IC<sub>50</sub> 值(来自竞争性结合实验)和对于磷酸肌醇(IP)积累的 EC<sub>50</sub> 值和对细胞生长的抑制(AP)。显示了平均值(nM) ± S. E. M.,在括号中标明了实验数目。\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.005。在大鼠 GnRH 受体中使用 GnRH 受体。

[0254] 表 2 :HEK293/hGnRHR 细胞中天然的和突变的 GnRH 肽对于磷酸肌醇(IP)积累的 EC<sub>50</sub> 值和对细胞生长的抑制(AP)。显示了平均值(nM) ± S. E. M.,在括号中标明了实验数目。\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.005。在人类 GnRH 受体中使用 GnRH 受体。

[0255] 图 9 :

[0256] 肽 24、26 和 28 对 HEK293/hGnRH 细胞增殖的抑制(如表 3 中所指定)。细胞以激动剂持续处理 5 天,然后在台盼蓝温育之后,使用血球计对活细胞进行计数。曲线代表至少三个独立实验中的一个,其中每个点代表三次重复的平均值,S. E. M 作为误差条显示。以未经处理的细胞数目对数值进行标准化。

[0257] 图 10 :

[0258] 肽 21 对 HEK293/hGnRH 细胞增殖的抑制(如表 3 中所指定)。细胞以激动剂持续处理 5 天,然后在台盼蓝温育之后,使用血球计对活细胞进行计数。曲线代表至少三个独立实验中的一个,其中每个点代表三次重复的平均值,S. E. M 作为误差条显示。以未经处理的细胞数目对数值进行标准化。

[0259] 图 11 :

[0260] 肽 4 和 6 对 HEK293/hGnRH 细胞增殖的抑制(如表 3 中所指定)。细胞以激动剂持续处理 5 天,然后在台盼蓝温育之后,使用血球计对活细胞进行计数。曲线代表至少三个独立实验中的一个,其中每个点代表三次重复的平均值,S. E. M 作为误差条显示。以未经处理的细胞数目对数值进行标准化。

[0261] 图 12 :

[0262] 肽 11 和 27 对 HEK293/hGnRH 细胞增殖的抑制(如表 3 中所指定)。细胞以激动剂持续处理 5 天,然后在台盼蓝温育之后,使用血球计对活细胞进行计数。曲线代表至少三个独立实验中的一个,其中每个点代表三次重复的平均值,S. E. M 作为误差条显示。以未经处

理的细胞数目对数值进行标准化。

[0263] 图 13：

[0264] 肽 10、11、15 和 23 对 HEK293/hGnRH 细胞增殖的抑制（如表 3 中所指定）。细胞以激动剂持续处理 5 天，然后在台盼蓝温育之后，使用血球计对活细胞进行计数。曲线代表至少三个独立实验中的一个，其中每个点代表三次重复的平均值，S. E. M 作为误差条显示。以未经处理的细胞数目对数值进行标准化。

[0265] 图 14：

[0266] 肽 13、65 和 66 对 HEK293/hGnRH 细胞增殖的抑制（如表 3 中所指定）。细胞以激动剂持续处理 5 天，然后在台盼蓝温育之后，使用血球计对活细胞进行计数。曲线代表至少三个独立实验中的一个，其中每个点代表三次重复的平均值，S. E. M 作为误差条显示。以未经处理的细胞数目对数值进行标准化。

[0267] 表 3：

[0268] GnRH 类似物对 HEK293/hGnRH 细胞的细胞数目的抑制和产生磷酸肌醇的抑制。

[0269] 本说明书中对以前发表的文献的列举或讨论不应该被认为是承认该文献为现有技术的一部分或者是公知常识。

[0270] 为了更完整的描述本申请相关的现有技术，在本申请中引用了几个公开和专利文献。这些引用中每个均在这里引入作为参考。

[0271] 实施例 1- 实验数据

[0272] 材料和方法

[0273] 材料

[0274] GnRH I 和 GnRH II 购买自 Sigma-Aldrich Co. Ltd. (Poole, Dorset, UK)。经改造的 GnRH 类似物购买自 Roger Roeske (University of Indiana, Indianapolis, USA)。抗-磷酸化 ERK1/2 和抗 ERK2 抗血清购买自 New England Biolabs (UK) Ltd. (NEB; Hitchin, Herts, UK)。抗-经切割聚 [ADP 核糖] 聚合酶 (PARP) 抗体 (Asp214/Gly215; 人类特异性的) 购买自 Cell Signalling Technology, Inc. (Beverly, MA, USA)。所有的二抗购买自 Sigma。化学抑制剂 JNK 抑制剂 II、PD98059 (MEK 抑制剂)、SB203580 (p38MAPK 抑制剂)、渥曼青霉素 (wortmannin) (PI-3K 抑制剂)、除莠霉素 A (herbimycin A) (酪氨酸激酶抑制剂)、PP2 (Src 抑制剂)、AG1478 (EGFR 抑制剂)、U-73122 (PLC 抑制剂)、Ro-31-8220 (PKC 抑制剂) 和 Gö 6983 (PKC 抑制剂) 购买自 Calbiochem (Calbiochem/Merck Biosciences Ltd.; Nottingham, East Midlands, UK)，而 PTX (Gi 抑制剂) 来自 Biomol (Biomol International; Exeter, Devon, UK)、2-APB (2 氨基乙基 - 二苯基硼酸盐) (IP3 诱导的 Ca<sup>2+</sup> 释放的抑制剂) 来自 Sigma。

[0275] 细胞培养

[0276] 表达不同的 GnRH 受体构建体的稳定的 HEK293 细胞系属于实验室贮藏且已用于其他的研究（例如 Heding 等人，1998）。细胞在 37°C 下加湿的 5% CO<sub>2</sub> 空气中在补充了 10% 胎牛血清、2% 谷氨酸盐和 1% 青霉素 (10,000 单位/ml) / 链霉素 (10,000 μg/ml) 的 Dulbecco's modified Eagles medium (DMEM) (Sigma) 中保持。细胞在 37°C 下在含有血清的培养液中以不同的分子浓度和时间长度进行处理，如图解中所标示。所用的用于研究 PARP 切割机理的化学抑制剂的浓度为：5 μM JNK 抑制剂 II、20 μM PD98059、20 μM SB203580、

25nM 渥曼青霉素、200ng/ml PTX、1  $\mu$  M 除莠霉素 A、5  $\mu$  M PP2、10  $\mu$  MAG1478、5  $\mu$  M U-73122、100nM Ro-31-8220、1  $\mu$  M Gö 6983 和 20  $\mu$  M 2-APB。

#### [0277] 免疫杂交

[0278] 在 6 孔板中刺激细胞之后,将细胞单层置于冰上,在冰冷的 Dulbecco's 磷酸盐缓冲液 (DPBS) 中洗涤两次并在基于 NP-40 的溶解缓冲液 (5mM HEPES、0.25M NaCl、0.5% NP-40、10% 甘油、2mM EDTA, pH8.0、1mM PMSF、0.01mg/ml 亮抑酶肽 (leupeptin)、1mM Na<sub>2</sub>VO<sub>4</sub> 进行裂解。通过离心 (15,000rpm) 15 分钟对溶解层进行澄清。将 50  $\mu$  l 等分试样的澄清全细胞裂解液与等体积的 2x Laemmli 样品缓冲液混合,在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 上分离并转移至 PVDF 膜 (NEN Life Sciences/PerkinElmer Life and Analytical Sciences; Beaconsfield, Bucks, UK)。这些膜在 4% 的牛血清白蛋白、50mM Tris-HCl, pH 7.0、0.05% Tween-20 和 0.05% NP-40 封闭溶液中进行封闭。磷酸化的 ERK1/2 以 1 : 1,000 稀释的抗-磷酸化特异性 ERK1/2 兔子多克隆抗体 (NEB) 进行检测。细胞凋亡通过 4°C 下以 1 : 1,000 稀释的抗-经切割 PARP 兔子多克隆抗体温育 PVDF 膜并缓慢振动过夜进行检测。通过接下来的将针对未磷酸化形式的 ERK2 (NEB) 的抗血清应用到一抗剥离 (primary antibody-stripped) 的免疫杂交来对这些反应的程度进行标准化。在所用的情况下使用碱性磷酸酶偶联的 IgG (Sigma) 作为二抗。使用酶联化学荧光 (Amersham Biosciences Ltd.; St. Giles, Bucks, UK) 进行蛋白显示并使用 Typhoon9400 Phosphorimager 进行定量。

#### [0279] 细胞存活性和数目

[0280] 对于第一个方法,将表达不同的 GnRH 受体构建体的 HEK293 细胞植于 12 孔 PLL 包被的板,每孔 50,000 个细胞 (1ml),持续暴露于 GnRH 培养 5 天,每天加入新鲜的肽。用血球计对台盼蓝排除的细胞进行计数。对于第二个方法,将细胞植于 96 孔板,每孔 5,000 个细胞 (100  $\mu$  l),用和以前所描述过的完全相同的方法进行处理。直接向每个孔加入 10  $\mu$  l WST-1 反应试剂 (Roche Diagnostics Ltd.; Lewes, East Sussex, UK), 37°C 下 3 小时之后,使用微量滴定板 ELISA 读数器在 450nm 处 (在 690nm 处作参考) 针对背景对照读出吸光度。

#### [0281] 胸苷摄入测定

[0282] 除去 24 孔 PLL 包被的板中细胞生长的培养液,向每个孔加入完全新鲜培养液中的 0.5  $\mu$  Ci 的 [3H] 胸苷 (Amersham)。温育过夜,然后除去培养液,以 1ml PBS 洗涤细胞三次,置于室温下 0.5ml 0.1N NaOH 中 15 分钟。然后将提取物转移至闪烁小瓶,加入 2ml 的 Optiphase "HiSafe 3" 鸡尾酒 (PerkinElmer),在 liquid scintillation 1450 Wallac Micro Beta® TriLux counter 中对 3H 计数进行测定。

#### [0283] 结合测试

[0284] 80pM [125I] [His5, D-Trp6] GnRH I 与表达 GnRH 受体的 HEK293 的特异性结合计算为:在各种未标记配体不存在和存在的情况下, GnRH I 结合数量的差异。在含有 80pM 放射性配体 (100,000cpm) 和 10<sup>-6</sup>-10<sup>-12</sup>M 未标记配体的结合缓冲液 (10mM HEPES, 在 DMEM 中含 1% BSA) 中温育生长于 12 孔 PLL 包被的板中的细胞单层。在 4°C 下温育 4 小时后达到平衡。然后在 0.1M NaOH 中裂解细胞,在 1261 Wallac MultiGamma counter 中测定提取物中的放射活性。

#### [0285] 总磷酸肌醇的积累

[0286] 以不含肌醇的 DMEM(Sigma) 中的  $1 \mu\text{Ci/ml}$  myo-[H3] 肌醇 (Amersham) 对生长于 12 孔 PLL 包被的板中的稳定表达不同的 GnRH 受体的 HEK293 细胞进行预标记 48 小时。在实验那天,以测试缓冲液 (140mM NaCl、20mM HEPES、8mM glucose、4mM KCl、1mM  $\text{MgCl}_2$ 、1mM  $\text{CaCl}_2$ 、1mg/ml BSA) 洗涤细胞,以 10mM LiCl (在测试缓冲液中) 预温育细胞 30 分钟,以不同浓度的肽 (在同样的缓冲液中) 在  $37^\circ\text{C}$  下刺激细胞 1 个小时。通通过除去培养液来终止温育,在冰冷的 10mM 蚁酸中裂解细胞 30 分钟。以阴离子交换树脂 (AG® 1-X8, Bio-Rad) 使用 1M 蚁酸铵和 0.1M 蚁酸通过色谱来提取磷酸肌醇。向最终洗脱液中加入液体闪烁剂,在  $\beta$ -计数器中测定 [3H] 磷酸肌醇。

#### [0287] 数据分析

[0288] 条形图和曲线通过 Prism 3.0 (GraphPad Software, Inc. :San Diego, CA, USA) 来获得。用非线性回归分析来确定  $\text{IC}_{50}$  和  $\text{EC}_{50}$  值。曲线在单位点模型中进行最优拟合。所显示的图代表至少三个独立实验的一个,其中每个点代表三次重复数值的平均值,作为误差条显示平均标准误差 (S. E. M),除非另有指明。以图示说明中所指明的对数值进行标准化。

#### [0289] 结果

##### [0290] 缺少 C 末端尾巴是对转导细胞生长抑制的受体要求

[0291] 据我们所知,抑制表达 GnRH 同类受体的细胞生长的能力是只在 GnRH 中所清晰描述的特性,由于 I 类 GnRH 受体 (GnRHR) 是唯一的缺少细胞内 C 末端尾巴的 G 蛋白偶联受体,我们假设 GnRH 抑制细胞生长的能力是由 GnRHR 的这个独特的特点所赋予的。我们比较了 GnRH I 对四种不同的 HEK293 细胞系 (稳定表达人类 GnRHR、大鼠 GnRHR 和两种嵌合受体,所述嵌合受体包含具有鳐鱼 GnRHR 尾巴的人类 GnRHR 和具有 TRH 受体 (TRHR) 尾巴的大鼠 GnRHR) 以及野生型 HEK293 细胞生长的效应。在 GnRH I 持续处理 5 天之后通过对细胞进行计数来确定细胞生长。加入 C 末端尾巴抑制了 GnRH I 对两种表达嵌合体的细胞系的效应 (图 1A)。GnRH I 没有抑制过量表达鳐鱼 GnRHR 或 TRHR 的 HEK293 细胞的生长 (数据未显示)。我们未能检测野生型 HEK293 细胞 (内源地表达肾上腺素的、LPA 和内皮素 (endothelin) 受体) 经他们相应的激动剂刺激后对生长的抑制 (数据未显示)。所有提及的受体表达通过结合测试或 western 杂交来确定 (数据未显示)。我们也排除了 II 类 GnRHR 的存在,因为 135-18 肽 (其为 I 类受体拮抗剂但是为 II 类受体激动剂) 阻断了 GnRH I 的抗增殖效应,且未诱导磷酸肌醇的累积或者对这些细胞的生长抑制。

##### [0292] ERK 脱敏图谱

[0293] 由于不存在 C 末端尾巴, GnRHR 不迅速脱敏,这导致延长的 PLC $\beta$  激活 (例如 McArdle 2002)。我们决定研究缺少迅速脱敏是否对其他的与 GnRH 的抗增殖 / 细胞凋亡特性更加相关的反应同样适用。表达大鼠 GnRHR 或大鼠 GnRHR/TRHR 嵌合体的 HEK293 细胞以 100nM GnRH I 进行不同时间的处理,通过 western 杂交来确定 ERK 的激活。如图 1B 中所示,在表达缺少 C 末端尾巴的细胞中 ERK 的激活更加持续。

##### [0294] DNA 合成的抑制伴随的细胞凋亡产生细胞生长的抑制

[0295] 我们研究了 GnRH 对表达大鼠受体的 HEK293 细胞的生长抑制是由于对细胞增殖的抑制还是由于细胞凋亡的诱导。在一个方面,我们使用了有放射活性的胸苷摄入基因组来追踪 96 小时内的细胞增殖。相对于未经处理的细胞来说,以 GnRH I 和更清楚的, GnRH

II (100nM) 持续处理减少了 DNA 复制 (图 2A)。在另一个方面,我们通过监测聚 [ADP-核糖] 聚合酶 (PARP) (其为 caspase 3 的底物) 检测了细胞凋亡。使用这个结果, GnRH II (100nM) 诱导的细胞凋亡在第一次处理之后 24 小时立即确定地表现出来, 而 GnRH I 在同样的条件下至少需要 48 小时来诱导对 PARP 的切割 (图 2B)。在细胞质中经切割的 PARP 的增加与细胞核中经切割的 PARP 的增加成比例 (数据未显示), 所以为了技术上的简便, 我们只是常规地检测了澄清的全细胞裂解物。

#### [0296] 细胞凋亡的分子机理

[0297] 利用在 HEK293/rGnRHR 细胞系中的 PARP 检测所获得的相对迅速和强烈的信号的优势, 我们使用一大组化学抑制剂研究了介导这个效应的细胞内机理。以亚汇合 (subconfluence) 来培养细胞, 在完全培养液中在抑制剂不存在或存在的情况下以 100nM 激动剂对细胞进行处理 48 小时。然后, 将细胞裂解并以特异性抗经切割 PARP 抗体进行 western 杂交, 如以前所解释的那样。如图 3 中所示, 五个抑制剂阻断了超过 50% 的总的由激动剂诱导的 caspase 3 激活; 即 PD98059 ( $17 \pm 6$ ;  $14 \pm 13$ )、除莠霉素 A ( $9 \pm 1$ ;  $41 \pm 4$ )、PP2 ( $20 \pm 4$ ;  $18 \pm 2$ )、Gö 6983 ( $47 \pm 22$ ;  $35 \pm 18$ ) 和 AG1478 ( $13 \pm 10$ ;  $18 \pm 11$ ) (括号中的数字为剩余的分别由 GnRH I 和 GnRH II 诱导的 PARP 的切割的平均值  $\pm$  S. E. M.)。JNKII 抑制剂也减少了由 GnRH I 和 GnRH II 诱导的细胞凋亡, 但是程度较低 ( $84 \pm 29$ ;  $72 \pm 22$ )。顺便提及, 一些抑制剂的结果应该经过仔细的分析, 因为细胞毒性 (SB203580 和 2-APB 其本身引起显著性 PARP 切割) 或在个别测试中巨大的差异性 (SB203580、PTX 和渥曼青霉素)。

#### [0298] 类似物相对于细胞生长抑制的结构-活性关系

[0299] 因此, GnRH II 似乎在诱导同样的细胞系的抗增殖和细胞凋亡上比 GnRH I 更加有效。十肽 GnRH I 和 GnRH II 在三个氨基酸上不同, 因此 GnRH II 可看做是 GnRH I 的类似物。我们决定研究 GnRH 的类似物相对于其抗增殖 / 细胞凋亡效应的结构-活性关系, 由此建立第一个这个类型的报告。将三个不同的氨基酸 (即 His5、Trp7 和 Tyr8) 个别地引入或成对地引入 GnRH I 序列中, 产生介于 GnRH I 和 GnRHII 中间的六个不同的结构类似物。

[0300] 通过确定在持续 5 天暴露于肽之后的细胞数目来评估抗增殖 / 细胞凋亡。平行地, 将这个反应与经典的由 GnRH 肽诱导的 Gq 偶联的 PLC $\beta$  激活 (通过非常明确的磷酸肌醇沉积程序进行测定) 相比较。在两个 HEK293 细胞系 (一个为表达大鼠受体的, 另一个为表达人类受体的) 中确定了两个结果。在研究中包括了人类细胞系, 因为这个物种可能具有更高的临床相关性, 其非常低的受体表达可更好的反映体内肿瘤状态。事实上, 由于结合较弱, 不能够确定类似物在这个细胞系上的精确的亲和力。

[0301] 所有的类似物的亲和力准确地与它们的刺激磷酸肌醇积累的能力相关, 但是不与它们的产生抗增殖 / 细胞凋亡的能力相关 (表 1-2, 图 4-8)。为了解释这一点, 在大鼠受体上, GnRH I 比 GnRH II 的激活 PLC $\beta$  的能力强 4.7 倍, 但是 GnRH II 的诱导细胞死亡的能力强 13.0 倍 (表 1, 图 5A 和 6A)。类似地, 在人类受体上, GnRH I 比 GnRH II 的激活 PLC $\beta$  的能力强 6.2 倍, 但是 GnRH II 的诱导细胞死亡的能力强 6.7 倍 (表 2, 图 7A 和 8A), [His5] GnRH I 表现出比 GnRH I 更高的亲和力 (表 1, 图 4B), 导致对所研究的两个反应来说更好的能力 (表 1-2, 图 5B、6B、7B 和 8B)。明显地, 这个类似物是曾经描述过的抗增殖 / 细胞凋亡性试剂中最强的。向 GnRH I 中引入 Trp7 没有改变天然肽的亲亲和性和激活 PLC $\beta$  的能力 (表 1-2, 图 4B、5B 和 7B)。但是, [Trp7]GnRH I 比 GnRH I 的抑制表达大鼠和人类受体的

细胞生长分别强 9.1 倍和 19.3 倍 (表 1-2, 图 6B 和 8B)。GnRH I 中的 Arg8 被 Tyr8 取代是唯一的改变, 这个改变导致产生最具选择性的抗增殖 / 细胞凋亡类似物。在大鼠受体上, [Tyr8]GnRH I 与 GnRH I 相比, 其刺激 PLC  $\beta$  的能力弱 27.3 倍, 但是抑制细胞生长的能力强 4.2 倍 (表 1, 图 5B 和 6B)。类似地, 在人类受体上, 这个类似物刺激 PLC  $\beta$  的能力弱 23.7 倍, 但是抑制细胞生长的能力强 10.7 倍, 同样是相对于天然肽来说 (表 2, 图 7B 和 8B)。显著地, 虽然这个类似物表现出非常低的亲和性 (表 1, 图 4B), 它仍然比 GnRH I 具有更强的产生细胞死亡的能力。在位置 5 引入 His 的两个双突变肽, 即 [His5, Trp7]GnRH I 和 [His5, Tyr8]GnRH I, 表现出的表型大致上可由单一取代来解释。因此, [His5, Trp7]GnRH I 具有与 GnRH I 相似的亲和性和刺激 PLC  $\beta$  的能力, 但是具有改善的抗增殖 / 细胞凋亡能力 (表 1-2, 图 4B、5B、6B、7B 和 8B)。[His5, Tyr8]GnRH I 表现出介于 GnRH I 和 [Tyr8]GnRH I 之间的特点 (表 1-2, 图 4B、5B、6B、7B 和 8B)。由于 Tyr8 取代而丧失的亲和力和接下来的降低的刺激 PLC  $\beta$  的能力似乎可通过 His5 的引入 (His5 的引入引起单一 [His5]GnRH I 类似物中增加的亲和性) 而部分获得恢复。如所预料的, [His5, Tyr8]GnRH I 比 GnRH I (和 [Tyr8]GnRH I) 的抑制细胞生长的能力强。最后, [Trp7, Tyr8]GnRH I 的特点几乎和 [Tyr8]GnRH I 的一样 (表 1-2, 图 4B、5B、6B、7B 和 8B)。

#### [0302] GnRH 位置 6 中 D-氨基酸取代对 HEK293/ 人类 GnRH 受体细胞的效应

[0303] 在 GnRH II 和 GnRH I/II 嵌合体的位置 6 中进行了一系列 D-氨基酸取代以建立具有高度抗增殖能力的结构。这揭示了具有比 GnRH II (例如肽 13、15、21、23、24、27 和 28) 强 10 倍的类似物和具有大于 10 倍的选择性的类似物 (例如肽 15、24、26 和 28)。

[0304] 一些类似物是特别强的 (例如肽 21、23 和 28)。一些类似物 (例如肽 4、11 和 28) 具有优先的抗增殖效应 (相对于磷酸肌醇产生来说)。

#### [0305] 讨论

[0306] 哺乳动物 GnRH 受体 (GnRHR) 是唯一不具有细胞内 C 末端尾巴的 GPCR (Millar 等人, 2004)。这里我们显示了这个结构特性赋予 GnRH 受体独特的性质: 调节细胞生长抑制的能力。过去曾经在很多细胞环境 (包括 HEK293 和促性腺细胞系, Blomenrohr 等人, 1999; Heding 等人, 1998; Heding 等人, 2000; Hislop 等人, 2001; Hislop 等人, 2000; Lin 等人, 1998; Pawson 等人, 1998; Vrecl 等人, 1998; Willars 等人, 1999) 中使用本研究中所用的同样的天然和嵌合受体来研究它们的脱敏和内在化图谱。这些研究证明: 非哺乳动物的尾巴还有磷酸基受体位点, 该位点与增加脱敏速率以激活 Gq/PLC  $\beta$  以及 GnRH 重复结合后的受体内在化相关联。也有报道有尾受体在细胞膜中有更高的表达 (Heding 等人, 1998; Lin 等人, 1998)。虽然 Hislop 等人 (2001) 记录了人类 (无尾) 和爪蟾属 (*Xenopus*) (有尾) 受体表现出相似的与 ERK 激活相关的脱敏式样, 但是我们观测到向大鼠受体加入尾巴也增加了 HEK293 细胞中这个反应的脱敏速率。这可暗示: C 末端尾巴的缺失可能给予哺乳动物 GnRH 受体以前未曾认识到的其它的功能上的特性。

[0307] 而且, 我们已经表明由 GnRH I 引起的 HEK293 细胞生长抑制是 DNA 合成抑制和细胞凋亡的组合作用的结果。这与以前的在这些和其它类型的细胞上所研究的关于 GnRH 作用的报告相一致 (Kim 等人, 2004a; Miles 等人, 2004; Maudsley 等人, 2004; Limonta 等人, 2003; Grundker, 2002)。而且, 使用一大系列化学抑制剂, 我们证明了 GnRH I 和 GnRH II 诱导的 HEK293 细胞凋亡需要 Src (EGF 受体)、ERK 和可能需要 PKC。虽然前三个元件的牵连

性是清楚的,但是 PKC 的作用更有争议。首先,PKC 抑制剂对 GnRH 刺激的细胞凋亡的效应程度(为 G $\delta$  6983 的 ~40%)没有其他的所引起的那么剧烈,这表明 PKC 可能不是引起 caspase 3 激活的主要信号级联的一部分。第二,用两个 PKC 抑制剂所获得的结果相互之间不一致。G $\delta$  6983 显然比 Ro-31-8220 更有效的减少 GnRH 的效应。这可以这样解释:因为两个分子阻断不同的 PKC 异构体或者因为在这个测试中所用的 Ro-31-8220 的浓度为次优化(sub-optimal)的。

[0308] 发现 EGFR 和 ERK 调节由 GnRH 诱导的细胞凋亡是出乎意料的,因为这些分子的激活通常与有丝分裂信号转导和细胞增殖相关联。确实,已经在一些癌细胞系中表明了 GnRH I 对 EGF 和 IGF 信号的干扰以及接下来的对 ERK 活性的下调(Limonta 等人,2003)。但是,最近也有数目增多的包括描述:ERK 是细胞凋亡反应的成分(例如, Song 等人,2005)。与 GnRH 系统有特别相关性的是,已经表明对 ERK 的抑制可阻断 Caov-3 人类卵巢癌细胞系中 GnRH I 诱导的细胞周期停滞以及 OVCAR3 人类卵巢癌细胞系中 GnRH II 诱导的 Elk-1 磷酸化(Kimura 等人,1999;Kim 等人,2004b)。ERK 将很多膜、细胞质和细胞核底物磷酸化,取决于它的细胞位置和激活的时间进程(Luttrell,2003)。在经高剂量的 GnRH 长时间处理(诱导细胞凋亡的要求)后的 HEK293/rGnRHR 中,我们发现,占主导地位的,对 ERK 细胞质库的延长的激活,这最终刺激 caspase 3 的活性。Ro 对 GnRH 诱导的细胞凋亡无效应,这可间接支持这个想法,因为已经表明 Ro-31-8220 抑制可调节转录效应的 ERK 的细胞核底物(RSK 和 MSK)(Davies 等人,2000)。

[0309] Farshori 等人(2003)报道:HEK293/小鼠 GnRHR 中 ERK 的激活由 PKC  $\delta$  和 Pyk2 介导,但是排除了 Src 和 EGF 受体的参与。虽然这与我们的结果明显对立,但是可能不是正确的,因为我们已经证明 Src、EGFR 和 ERK 在 GnRH 诱导的细胞凋亡中的作用,但是没有表明它们必然属于会聚于 ERK 的相同的信号途径。而且,实验条件根本上不同,即,无血清培养液中 10 分钟(Farshori 的 ERK 激活测试)相对于完全培养液中 48 小时(我们的 PARP 测试)。在其他的细胞环境中 EGFR 由 GnRH 所激活(Grosse 等人,2000;Kraus 等人,2004)。

[0310] 广谱的酪氨酸激酶抑制剂除莠霉素 A 和特异性 Src 家族酪氨酸激酶抑制剂 PP2 提出了这组激酶在 HEK293 细胞中由 GnRH 刺激的细胞凋亡中的作用。Src 参与垂体和 COS-7 细胞中由 GnRH 引起的 ERK 和 JNK 的激活(例如,Grosse 等人,2000;Kraus 等人,2004),且已经表明它可调节 JNK 的激活从而引起由 GnRH 诱导的 DU-145 前列腺癌细胞系的生长的抑制。此外,我们最近证明:在 HEK293/rGnRHR 细胞系中 GnRH I 激活 cSrc,然后 cSrc 与脂激酶 DGK  $\zeta$  结合(Davidson 等人,2004)。在这项研究中,我们没有解决 Src 是在 EGF 受体上游还是下游被激活。如果是上游,则 Src 应该被不同的效应子所激活,包括 PKC、 $\beta$   $\gamma$  或  $\alpha$  i G 蛋白亚基甚至是被与 GPCR 的直接相互作用所激活。

[0311] 与其他类型的细胞不同(例如 Maudsley 等人,2004),我们未能清楚地证明 G $\alpha$  i 调节 HEK293/rGnRHR 细胞的抗增殖。除了 PTX 对 GnRH 诱导的 caspase 3 激活没有任何效应之外,我们在这些细胞中通过亲近闪烁检测(Scintillation Proximity Assay, SPA)没有检测到 GnRH I 或 GnRH II 或 Gi 偶联至受体而对 FSK 激活的 cAMP 的抑制(Coetsee 等人,未发表结果)。对于 JNK 或 p38MAPK 对 GnRH 刺激的细胞凋亡的调节来说情况也是这样,虽然 SB203580 的毒性可能掩盖了任何 p38MAPK 的参与。但是,我们同意通常的观点,即 PLC(其代表经典的由 G $\alpha$  q 启动的垂体信号途径)不是细胞凋亡级联的相关部分。这与部分 PKC 的

参与不矛盾,因为极少有 PKC 异构体是 DAG 和  $\text{Ca}^{2+}$  非依赖性的 (Naor 等人,1998)。综上,可合理地推论:HEK293 细胞中 GnRH I 和 GnRH II 的细胞凋亡性效应可能不是由异质三聚体蛋白调节的,而是由其他相互作用性分子例如 Src、 $\beta$ -arrestin 或小的 G 蛋白调节的。

[0312] 开发用于癌症治疗的更有效的和更据选择性(这点更为重要)的试剂是非常关键的。直到目前,GnRH 系统中对于结构-活性关系的研究集中在配体调节 Gq/PLC $\beta$  的能力。因为我们现在知道这不是引起抗增殖的效应途径,所以在研究配体的 SAR 相对于细胞生长抑制的时候有必要监视其他的结果。在这个报告中,我们不仅研究了一系列类似物的结合活性和诱导磷酸肌醇积累的能力,而且第一次在细节上研究了对于产生细胞生长抑制的配体结构上的需要。为了这个目标,我们使用表达大鼠或人类 GnRHR 的 HEK293 细胞,后者具有非常低的受体数目。

[0313] 哺乳动物的 GnRH I 和 GnRH II 可被分成三个结构区域 (Millar 等人,2004; Sealfon 等人,1997)。N 末端 Glu1-His2-Trp3-Ser4 和 C 末端 Pro9-Gly10 序列在 500,000,000 年中一直是保守的。虽然两个区域均对受体结合起作用,但是只有 N 末端氨基酸对受体激活而引起 Gq 偶联是关键的。中间结构域在物种和在相同物种中存在的各种 GnRH 肽中保守性较低。这个区域在 GnRH I 中对应于 Tyr5-Gly6-Leu7-Arg8,在 GnRH II 中对应于 His5-Gly6-Leu7-Tyr8。GnRH 与 I 类哺乳动物 GnRH 受体的高亲和性相互作用需要配体有关这些残基的  $\beta$ -II 的转角构象 (Momany,1976 以及参考 Millar 等人,2004)。被提议的赋予这个构象的相互作用为 Ser4 和 Arg8 之间、Glu1 和 Gly10 之间和 / 或 Arg8 与 His2 和 Tyr5 之间 (Millar 等人,2004)。已经表明 Arg8 也可与保守性的 Asp302 在哺乳动物 GnRH 受体的第三个细胞外的环相互作用,这诱导或选择了  $\beta$ -II 转角构象 (Flanagan 等人,1994; Fromme 等人,2001)。Arg8 似乎不直接参与导致 Gq 刺激的受体激活,但是可能通过与 Asp302 结合而间接产生作用,因为已经推论这个残基建立和 Glu90-Asn102-Lys121- 激活三个一组的分子内接触 (Millar 等人,2004)。有证据表明:GnRH II 在  $\beta$ -II 转角构象中是预先成形的,这使其对所有的 GnRH 受体都有相对高的亲和性 (Pfleger 等人,2002)。

[0314] 我们的研究中所有的肽的亲合力均与以前使用大鼠垂体前叶膜或瞬间表达大鼠或人类受体的 COS-7 和 HEK293 细胞作出的报告是一致的 (Miles 等人,2004; Millar 等人,2004; Pfleger 等人,2002)。与 GnRH I 相比,GnRH II 显示出较低的诱导磷酸肌醇累积的能力,但是有较高的抑制相同的细胞生长的能力。GnRH I 中用 His5 取代 Tyr5 导致了亲和性的升高,这与所研究的两个反应中的较高的能力相关联。[His5]GnRH I 是 GnRH 系统中所描述过的最有力的细胞生长抑制剂。与 GnRH I 相比,用 Trp7 替代 Leu7 产生的类似物具有同样的刺激 PLC $\beta$  的能力,但是有更高的诱导对细胞生长的抑制的能力。用 Tyr8 取代 Arg8 产生了最具选择性的抗增殖 / 细胞凋亡性试剂。相对于 GnRH I 来说,它表现出低很多的结合亲和性和激活 PLC $\beta$  的能力。但是, [Tyr8]GnRH I 抑制细胞生长的能力强 4-11 倍。其他的突变肽表现出的功能性参数如从他们的介于 GnRH I 和 GnRH II 中间的结构参数所预料的那样。

[0315] 显著地,这个研究支持我们组以前对 GnRH 受体所建议的配体诱导的选择性信号传导 (ligand-induced selective signalling LISS) 概念 (Maudsley 等人,2004)。这可由 GnRH I 和 GnRH II 进行例证,其表明对两种反应 (PLC $\beta$  激活和细胞生长抑制) 来说成反向的力量比例。在具有单一类型的受体的系统中,两个具有相同的亲和性和相同的信号强

度的激动剂（在相对力量上的级别上表现相反）可能选择性地稳定不同的受体活性状态，每个主要负责所观测到的不同反应。

[0316] 总之，我们提供了涉及 GnRH 诱导的细胞生长抑制的受体药理学和细胞内机理，开辟了途径来合理设计用在基于 GnRH 的癌症治疗上的新类似物。

[0317] 实施例 2 示例性的药物组合物

[0318] 虽然单独使用本发明所述试剂是可能的，但是优选为将其与一个或一个以上可接受的载体一起呈现为药物组合物。载体必须是“可接受的”，意思是与本发明所述试剂相容并且对其接受者无害。通常，载体是无菌和无热原的水或盐。

[0319] 以下实施例解释了根据本发明所述的药物和药物组合物，其中活性成分是本发明所述试剂。

[0320] 优选地，本发明所述试剂以 10  $\mu$ g 至 500mg 的量来提供。应该认识到：以下示例性药物和药物组合物可制成还有 10  $\mu$ g 至 500mg 的本发明所述试剂。例如，本发明所述试剂可呈现为以下示例性药物和药物组合物中所显示数量的十分之一或百分之一或二百分之一或五百分之一，然后剩余的成分相应地改变。

[0321] 例 A :药片

[0322]	活性成分	1mg
[0323]	乳糖	200mg
[0324]	淀粉	50mg
[0325]	聚乙烯吡咯烷酮	5mg
[0326]	硬脂酸锰	4mg

[0327] 从前述成分通过湿法制粒 (wet granulation) 然后进行压缩来制备药片。

[0328] 例 B :眼液

[0329]	活性成分	1mg
[0330]	氯化钠,分析等级	0.9g
[0331]	硫柳汞	0.001g
[0332]	加纯化的水至	100ml
[0333]	调节 pH 至	7.5

[0334] 例 C :药片制剂

[0335] 通过将活性成分与聚维酮 (povidone) 溶液进行湿法成粒，然后加入硬脂酸锰并压缩来制备以下制剂 A 和 B。

[0336] 制剂 A

[0337]		mg/ 药片	mg/ 药片
[0338]	(a) 活性成分	1	1
[0339]	(b) 乳糖 B. P.	210	26
[0340]	(c) 聚维酮 B. P.	15	9
[0341]	(d) 羧甲基淀粉钠	20	12
[0342]	(e) 硬脂酸锰	5	3
[0343]		-	
[0344]		251	51

[0345] 制剂 B

[0346]		mg/ 药片	mg/ 药片
[0347]	(a) 活性成分	1	1
[0348]	(b) 乳糖	150	-
[0349]	(c) Avicel PH 101 <sup>®</sup>	60	26
[0350]	(d) 聚维酮 B. P.	15	9
[0351]	(e) 羧甲基淀粉钠	20	12
[0352]	(f) 硬脂酸锰	5	3
[0353]		-	
[0354]		251	51

[0355] 制剂 C

[0356]		mg/ 药片
[0357]	活性成分	1
[0358]	乳糖	200
[0359]	淀粉	50
[0360]	聚维酮	5
[0361]	硬脂酸锰	4
[0362]		-
[0363]		260

[0364] 通过直接压缩制备以下制剂 D 和 E。制剂 E 中所用的乳糖为直接压缩类型的。

[0365] 制剂 D

[0366]		mg/ 胶囊
[0367]	活性成分	1
[0368]	预胶化淀粉 NF15	150
[0369]		-
[0370]		151

[0371] 制剂 E

[0372]		mg/ 胶囊
[0373]	活性成分	1
[0374]	乳糖	150
[0375]	Avicel <sup>®</sup>	100
[0376]		-
[0377]		251

[0378] 制剂 F (控释制剂)

[0379] 通过将成分 (如下) 与聚维酮溶液进行湿法成粒, 然后加入硬脂酸锰并压缩来制备制剂。

[0380]		mg/ 药片
[0381]	(a) 活性成分	1
[0382]	(b) 羟基丙基甲基纤维素	112

[0383]

(Methocel K4M Premium)<sup>®</sup>

[0384] (c) 乳糖 B. P. 53

[0385] (d) 聚维酮 B. P. C. 28

[0386] (e) 硬脂酸锰 7

[0387] -

[0388] 201

[0389] 药物释放在大约 6-8 小时内发生,12 小时后进行完全。

[0390] 例 D: 胶囊制剂[0391] 制剂 A

[0392] 通过将上述例 C 中制剂 D 的活性成分混合并填入至两部分的硬质凝胶胶囊中来制备胶囊制剂。制剂 B(以下)以同样的方式来制备。

[0393] 制剂 B

[0394] mg/ 胶囊

[0395] (a) 活性成分 1

[0396] (b) 乳糖 B. P. 143

[0397] (d) 羧甲基淀粉钠 25

[0398] (e) 硬脂酸锰 2

[0399] -

[0400] 171

[0401] 制剂 C

[0402] mg/ 胶囊

[0403] (a) 活性成分 1

[0404] (b) Macrogol 4000BP 350

[0405] -

[0406] 351

[0407] 通过熔化 Macrogol 4000BP,将活性成分分散于熔化物并将熔化物填入至两部分的硬质凝胶胶囊中来制备胶囊。

[0408] 制剂 D mg/ 胶囊

[0409] 活性成分 1

[0410] 卵磷脂 100

[0411] 落花生油 100

[0412] -

[0413] 201

[0414] 通过将活性成分分散于卵磷脂和落花生油中并将分散物填入软质有弹性的凝胶胶囊中来制备胶囊。

[0415] 制剂 E(控释胶囊)

[0416] 通过挤压器来挤压成分 a、b 和 c 然后将挤压物滚圆并干燥来制备以下控释胶囊。然后将干燥的沉淀以控释膜 (d) 进行包被并填入两片的硬质凝胶胶囊。

[0417]		mg/ 胶囊
[0418]	(a) 活性成分	1
[0419]	(b) 微晶纤维素	125
[0420]	(c) 乳糖 BP	125
[0421]	(d) 乙基纤维素	13
[0422]		-
[0423]		264

[0424] 例 E:可注射制剂[0425] 活性成分 1mg

[0426] 加无菌,无热原磷酸盐缓冲液 (pH7.0) 至 10ml。

[0427] 将活性成分溶于大部分的磷酸盐缓冲液 (35-40°C),然后制成所需体积并经过无菌微孔过滤器过滤至无菌的 10ml 琥珀瓶 (1 类) 并用无菌的封闭物和 overseal 密封。

[0428] 例 F:肌肉注射

[0429] 活性成分 1mg

[0430] 苯甲基醇 0.10g

[0431] 四氢呋喃聚乙二醇醚 75<sup>®</sup> 1.45g

[0432] 加用于注射的水 q. s. 至 3.00ml

[0433] 将活性成分溶于四氢呋喃聚乙二醇醚 (Glycofurol)。然后加入苯甲基醇并熔解,加水至 3ml。然后混合物通过无菌微孔过滤器过滤并密封于无菌的 3ml 玻璃瓶 (1 类)。

[0434] 例 G. 糖浆悬浮液

[0435] 活性成分 1mg

[0436] 山梨醇溶液 1.5000g

[0437] 甘油 2.0000g

[0438] 可分散纤维素 0.0750g

[0439] 安息香酸钠 0.0050g

[0440] 香味的桃子 17.42.3169 0.0125ml

[0441] 加纯化的水 q. s 至 5.0000ml

[0442] 将安息香酸钠溶于一部分纯化的水并加入山梨醇溶液。加入活性成分并分散。增稠剂分散于甘油 (可分散纤维素)。将两个分散物混合并用纯化的水制成所需体积。如果需要的话通过对悬浮液进行另外的剪切来达到进一步增浓。

[0443] 例 H:栓剂

[0444] mg/ 栓剂

[0445] 活性成分 (63 μ m)\* 1

[0446] 硬脂肪, BP (Witepsol H15-Dynamit Nobel) 1770

[0447] -

[0448] 1771

[0449] \* 活性成分用作粉末,其中至少 90%的颗粒直径为 63 μ m 或更小。

[0450] 在蒸汽加套平底锅中在最高 45°C 下将五分之一的 Witepsol H15 熔化。将活性成分过 200 μ m 的筛子筛,使用带有刻纹头的 silverson 通过混合加入到熔熔铸模,直至达到

平滑的分散。将混合物保持在 45℃,将剩余的 Witepsol H15 加入到悬浮液中并搅拌以形成匀质混合物。将整个悬浮液过 250 μ m 不锈钢的筛子并保持持续搅拌,使其冷却至 40℃。在 38℃至 40℃的温度下,将 2.02g 的混合物加入到合适的塑料模具。将栓剂冷却至室温。

[0451] 例 1:子宫托

[0452] mg/ 子宫托

[0453] 活性成分 1

[0454] 无水葡萄糖 380

[0455] 马铃薯淀粉 363

[0456] 硬脂酸锰 7

[0457] -

[0458] 751

[0459] 将以上成分直接混合,通过直接压缩其余成分来制备子宫托。

[0460] 本发明所述试剂也可制成诺雷德 (Zoladex)、亮丙瑞林 (Leuprolide)、替维瑞克 (Teverelix)、阿巴瑞克 (Abarelix)、加尼瑞克 (Ganarelix)、戈舍瑞林 (Goserelin) 等。

[0461] 实施例 3- 使用本发明所述试剂治疗增殖性失调

[0462] 根据本发明所述方法,通过肌肉向患有前列腺癌的病人 (其对抗男性激素治疗无反应) 每天使用 1mg 本发明所述试剂。

[0463] 参考文献

[0464] Blomenrohr, M., Heding, A., Sellar, R., Leurs, R., Bogerd, J., Eidne, K. A. and Willars, G. B. (1999) Pivotal role for the cytoplasmic carboxyl-terminal tail of a nonmammalian gonadotropin-releasing hormone receptor in cell surface expression, ligand binding, and receptor phosphorylation and internalization. *Mol Pharmacol*, 56, 1229-1237.

[0465] Heding, A., Vrecl, M., Bogerd, J., McGregor, A., Sellar, R., Taylor, P. L. and Eidne, K. A. (1998) Gonadotropin-releasing hormone receptors with intracellular carboxyl-terminal tails undergo acute desensitization of total inositol phosphate production and exhibit accelerated internalization kinetics. *J Biol Chem*, 273, 11472-11477.

[0466] Heding, A., Vrecl, M., Hanyaloglu, A. C., Sellar, R., Taylor, P. L. and Eidne, K. A. (2000) The rat gonadotropin-releasing hormone receptor internalizes via a beta-arrestin independent, but dynamin-dependent, pathway: addition of a carboxyl-terminal tail confers beta-arrestin dependency. *Endocrinology*, 141, 299-306.

[0467] Hislop, J. N., Everest, H. M., Flynn, A., Harding, T., Uney, J. B., Troskie, B. E., Millar, R. P. and McArdle, C. A. (2001) Differential internalization of mammalian and non-mammalian gonadotropin-releasing hormone receptors. Uncoupling of dynamin-dependent internalization from mitogen-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem*, 276, 39685-39694.

[0468] Hislop, J. N., Madziva, M. T., Everest, H. M., Harding, T., Uney, J. B.,

Willars, G. B. , Millar, R. P. , Troskie, B. E. , Davidson, J. S. and McArdle, C. A. (2000) Desensitization and internalization of human and xenopus gonadotropin-releasing hormone receptor expressed in alphaT4 pituitary cells using recombinant adenovirus. *Endocrinology*, 141, 4564-4575.

[0469] Lin, X. , Janovick, J. A. , Brothers, S. , Blumenrohr, M. , Bogerd, J. and Conn, P. M. (1998) Addition of catfish gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor intracellular carboxyl-terminal tail to rat GnRH receptor alters receptor expression and regulation. *Mol Endocrinol*, 12, 161-171.

[0470] Millar, R. P. , Lu, Z. L. , Pawson, A. J. , Flanagan, C. A. , Morgan, K. and Maudsley, S. R. (2004) Gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocr Rev*, 25, 235-275.

[0471] Pawson, A. J. , Katz, A. , Sun, Y. M. , Lopes, J. , Illing, N. , Millar, R. P. and Davidson, J. S. (1998) Contrasting internalization kinetics of human and chick gonadotropin-releasing hormone receptors mediated by C-terminal tail. *J Endocrinol*, 156, R9-12.

[0472] Vrecl, M. , Anderson, L. , Hanyaloglu, A. , McGregor, A. M. , Groarke, A. D. , Milligan, G. , Taylor, P. L. and Eidne, K. A. (1998) Agonist-induced endocytosis and recycling of the gonadotropin-releasing hormone receptor: effect of beta-arrestin on internalization kinetics. *Mol Endocrinol*, 12, 1818-1829.

[0473] Willars, G. B. , Heding, A. , Vrecl, M. , Sellar, R. , Blumenrohr, M. , Nahorski, S. R. and Eidne, K. A. (1999) Lack of a C-terminal tail in the mammalian gonadotropin-releasing hormone receptor confers resistance to agonist-dependent phosphorylation and rapid desensitization. *J Biol Chem*, 274, 30146-30153.

[0474] Flanagan, C. A. , Becker, H. , Davidson, J. S. , Wakefield, I. K. , Zhou, W. , Sealson, S. C. and Millar, R. P. (1994) Glutamate 301 of the mouse gonadotropin-releasing hormone receptor confers specificity for arginine 8 of mammalian gonadotropin-releasing hormone. *J Biol Chem*, 269, 22636-22641.

[0475] Fromme, B. J. , Katz, A. A. , Roeske, R. W. , Millar, R. P. and Flanagan, C. A. (2001) Role of aspartate 7.32 (302) of the human gonadotropin-releasing hormone receptor in stabilizing a high-affinity ligand conformation. *Mol Pharmacol*, 60, 1280-1287.

[0476] Maudsley, S. , Davidson, L. , Pawson, A. J. , Chan, R. , López de Maturana, R. and Millar, R. P. (2004) Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) antagonists promote proapoptotic signaling in peripheral reproductive tumor cells by activating a G $\alpha$  coupling state of the type I GnRH receptor. *Cancer Res*, 64, 7533-7544.

[0477] Miles, L. E. , Hanyaloglu, A. C. , Dromey, J. R. , Pfleger, K. D. and Eidne, K. A. (2004) Gonadotropin-releasing hormone receptor-mediated growth suppression of immortalized L $\beta$ T2 gonadotrope and stable HEK293 cell lines. *Endocrinology*, 145, 194-204.

[0478] Millar, R. P. and Pawson A. J. (2004) Outside-in and inside-out signaling: the new concept that selectivity of ligand binding at the gonadotropin-releasing

hormonereceptor is modulated by the intracellular environment. *Endocrinology*, 145, 3590-359. 3

[0479] Millar, R. P., Flanagan, C. A., Milton, R. C. and King, J. A. (1989) Chimeric analogues of vertebrate gonadotropin-releasing hormones comprising substitutions of the variant amino acids in positions 5, 7, and 8. Characterization of requirements for receptor binding and gonadotropin release in mammalian and avian pituitary gonadotropes. *J. Biol Chem*, 264, 21007-21013.

[0480] Millar, R. P., Lu, Z. L., Pawson, A. J., Flanagan, C. A., Morgan, K. and Maudsley, S. R. (2004) Gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocr Rev*, 25, 235-275.

[0481] Pflieger, K. D., Bogerd, J. and Millar, R. P. (2002) Conformational constraint of mammalian, chicken, and salmon GnRHs, but not GnRH II, enhances binding at mammalian and nonmammalian receptors: evidence for preconfiguration of GnRH II. *Mol Endocrinol*, 16, 2155-2162.

[0482] Sealfon, S. C., Weinstein, H. and Millar, R. P. (1997) Molecular mechanisms of ligand interaction with the gonadotropin-releasing hormone receptor. *Endocr Rev*, 18, 180-205.

[0483] Grundker, C., Gunthert, A. R., Westphalen, S. and Emons, G. (2002) Biology of the gonadotropin-releasing hormone system in gynecological cancers. *Eur J Endocrinol*, 146, 1-14.

[0484] Grundker, C., Schlotawa, L., Viereck, V., Eicke, N., Horst, A., Kairies, B. and Emons, G. (2004) Antiproliferative effects of the GnRH antagonist cetrorelix and of GnRH-II on human endometrial and ovarian cancer cells are not mediated through the GnRH type I receptor. *Eur J Endocrinol*, 151, 141-149.

[0485] Heding, A., Vrecl, M., Bogerd, J., McGregor, A., Sellar, R., Taylor, P. L. and Eidne, K. A. (1998) Gonadotropin-releasing hormone receptors with intracellular carboxyl-terminal tails undergo acute desensitization of total inositol phosphate production and exhibit accelerated internalization kinetics. *J Biol Chem*, 273, 11472-11477.

[0486] Limonta, P., Moretti, R. M., Marelli, M. M. and Motta, M. (2003) The biology of gonadotropin hormone-releasing hormone: role in the control of tumor growth and progression in humans. *Front Neuroendocrinol*, 24, 279-295.

[0487] Maudsley, S., Davidson, L., Pawson, A. J., Chan, R., López de Maturana, R. and Millar, R. P. (2004) Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) antagonists promote proapoptotic signaling in peripheral reproductive tumor cells by activating a G $\alpha$  coupling state of the type I GnRH receptor. *Cancer Res*, 64, 7533-7544.

[0488] Millar, R. P., Lu, Z. L., Pawson, A. J., Flanagan, C. A., Morgan, K. and Maudsley, S. R. (2004) Gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocr Rev*, 25, 235-275.

[0489] Enomoto, M., Endo, D., Kawashima, S. and Park, M. K. (2004) Human type II GnRH receptor mediates effects of GnRH on cell proliferation. *Zoolog Sci*, 21,

763-770.

[0490] Grundker, C., Gunthert, A. R., Westphalen, S. and Emons, G. (2002) Biology of the gonadotropin-releasing hormone system in gynecological cancers. *Eur J Endocrinol*, 146, 1-14.

[0491] Grundker, C., Schlotawa, L., Viereck, V., Eicke, N., Horst, A., Kairies, B. and Emons, G. (2004) Antiproliferative effects of the GnRH antagonist cetrorelix and of GnRH-II on human endometrial and ovarian cancer cells are not mediated through the GnRH type II receptor. *Eur J Endocrinol*, 151, 141-149.

[0492] Kaiser, U. B., Conn, P. M. and Chin, W. W. (1997) Studies of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) action using GnRH receptor-expressing pituitary cell lines. *Endocr Rev*, 18, 46-70.

[0493] Limonta, P., Moretti, R. M., Marelli, M. M. and Motta, M. (2003) The biology of gonadotropin-releasing hormone: role in the control of tumor growth and progression in humans. *Front Neuroendocrinol*, 24, 279-295.

[0494] Millar, R. P., Lu, Z. L., Pawson, A. J., Flanagan, C. A., Morgan, K. and Maudsley, S. R. (2004) Gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocr Rev*, 25, 235-275.

[0495] Morgan, K., Conklin, D., Pawson, A. J., Sellar, R., Ott, T. R. and Millar, R. P. (2003) A transcriptionally active human type II gonadotropin-releasing hormone receptor gene homolog overlaps two genes in the antisense orientation on chromosome 1q.12. *Endocrinology*, 144, 423-436.

[0496] Neill, J. D., Musgrove, L. C. and Duck, L. W. (2004) Newly recognized GnRH receptors: function and relative role. *Trends Endocrinol Metab*, 15, 383-392.

[0497] Chen, A., Kaganovsky, E., Rahimipour, S., Ben-Aroya, N., Okon, E. and Koch, Y. (2002) Two forms of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) are expressed in human breast tissue and overexpressed in breast cancer: a putative mechanism for the antiproliferative effect of GnRH by down-regulation of acidic ribosomal phosphoproteins P1 and P2. *Cancer Res*, 62, 1036-1044.

[0498] Davies, S. P., Reddy, H., Caivano, M. and Cohen, P. (2000) Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J*, 351, 95-105.

[0499] Grosse, R., Roelle, S., Herrlich, A., Hohn, J. and Gudermann, T. (2000) Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase mediates Ras activation by gonadotropin-releasing hormone. *J Biol Chem*, 275, 12251-12260.

[0500] Kim, K. Y., Choi, K. C., Park, S. H., Auersperg, N. and Leung, P. C. (2004a) Extracellular signal-regulated protein kinase, but not c-Jun N-terminal kinase, is activated by type II gonadotropin-releasing hormone involved in the inhibition of ovarian cancer cell proliferation. *J Clin Endocrinol Metab*.

[0501] Kim, K. Y., Choi, K. C., Park, S. H., Chou, C. S., Auersperg, N. and Leung, P. C. (2004b) Type II gonadotropin-releasing hormone stimulates

p38mitogen-activated protein kinase and apoptosis in ovarian cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 89, 3020-3026.

[0502] Kimura, A., Ohmichi, M., Kurachi, H., Ikegami, H., Hayakawa, J., Tasaka, K., Kanda, Y., Nishio, Y., Jikihara, H., Matsuura, N. and Murata, Y. (1999) Role of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase cascade in gonadotropin-releasing hormone-induced growth inhibition of a human ovarian cancer cell line. *Cancer Res*, 59, 5133-5142.

[0503] Kraus, S., Levy, G., Hanoch, T., Naor, Z. and Seger, R. (2004) Gonadotropin-releasing hormone induces apoptosis of prostate cancer cells: role of c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase, protein kinase B, and extracellular signal-regulated kinase pathways. *Cancer Res*, 64, 5736-5744.

[0504] Miles, L. E., Hanyaloglu, A. C., Dromey, J. R., Pfleger, K. D. and Eidne, K. A. (2004) Gonadotropin-releasing hormone receptor-mediated growth suppression of immortalized LbetaT2 gonadotrope and stable HEK293 cell lines. *Endocrinology*, 145, 194-204.

[0505] Naor, Z., Harris, D. and Shacham, S. (1998) Mechanism of GnRH receptor signaling: combinatorial cross-talk of Ca<sup>2+</sup> and protein kinase C. *Front Neuroendocrinol*, 19, 1-19.

[0506] Tanaka, Y., Gavrielides, M. V., Mitsuuchi, Y., Fujii, T. and Kazanietz, M. G. (2003) Protein kinase C promotes apoptosis in LNCaP prostate cancer cells through activation of p38 MAPK and inhibition of the Akt survival pathway. *J Biol Chem*, 278, 33753-33762.

[0507] Momany, F. A. (1976) Conformational energy analysis of the molecule, luteinizing hormone releasing hormone. I. Native decapeptide. *J Am Chem Soc*, 98, 2990-2996.

[0508] Enomoto, M., Endo, D., Kawashima, S. and Park, M. K. (2004) Human type II GnRH receptor mediates effects of GnRH on cell proliferation. *Zoolog Sci*, 21, 763-770.

[0509] Grundker, C., Gunthert, A. R., Westphalen, S. and Emons, G. (2002) Biology of the gonadotropin-releasing hormone system in gynecological cancers. *Eur J Endocrinol*, 146, 1-14.

[0510] Grundker, C., Schlotawa, L., Viereck, V., Eicke, N., Horst, A., Kairies, B. and Emons, G. (2004) Antiproliferative effects of the GnRH antagonist cetrorelix and of GnRH-II on human endometrial and ovarian cancer cells are not mediated through the GnRH type I receptor. *Eur J Endocrinol*, 151, 141-149.

[0511] Kaiser, U. B., Conn, P. M. and Chin, W. W. (1997) Studies of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) action using GnRH receptor-expressing pituitary cell lines. *Endocr Rev*, 18, 46-70.

[0512] Limonta, P., Moretti, R. M., Marelli, M. M. and Motta, M. (2003) The biology

of gonadotropin hormone-releasing hormone: role in the control of tumor growth and progression in humans. *Front Neuroendocrinol*, 24, 279-295.

[0513] Millar, R. P., Lu, Z. L., Pawson, A. J., Flanagan, C. A., Morgan, K. and Maudsley, S. R. (2004) Gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocr Rev*, 25, 235-275.

[0514] Morgan, K., Conklin, D., Pawson, A. J., Sellar, R., Ott, T. R. and Millar, R. P. (2003) A transcriptionally active human type II gonadotropin-releasing hormone receptor gene homolog overlaps two genes in the antisense orientation on chromosome 1q.12. *Endocrinology*, 144, 423-436.

[0515] Neill, J. D., Musgrove, L. C. and Duck, L. W. (2004) Newly recognized GnRH receptors: function and relative role. *Trends Endocrinol Metab*, 15, 383-392.

[0516] Song, P., Wei, J. and Wang, H. C. (2005) Distinct roles of the ERK pathway in modulating apoptosis of Ras-transformed and non-transformed cells induced by anticancer agent FR901228. *FEBS Lett*, 579, 90-94.

[0517] Davidson, L., Pawson, A. J., López de Maturana, R., Freestone, S. H., Barran, P., Millar, R. P. and Maudsley, S. (2004) Gonadotropin-releasing hormone-induced activation of diacylglycerol kinase- $\zeta$  and its association with active c-src. *J Biol Chem*, 279, 11906-11916.

[0518] Dikic, I. and Blaukat, A. (1999) Protein tyrosine kinase-mediated pathways in G-protein-coupled receptor signaling. *Cell Biochem Biophys*, 30, 369-387.

[0519] Farshori, P. Q., Shah, B. H., Arora, K. K., Martinez-Fuentes, A. and Catt, K. J. (2003) Activation and nuclear translocation of PKC $\delta$ , Pyk2 and ERK1/2 by gonadotropin-releasing hormone in HEK293 cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 85, 337-347.

[0520] Grosse, R., Roelle, S., Herrlich, A., Hohn, J. and Gudermann, T. (2000) Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase mediates Ras activation by gonadotropin-releasing hormone. *J Biol Chem*, 275, 12251-12260.

[0521] Kimura, A., Ohmichi, M., Kurachi, H., Ikegami, H., Hayakawa, J., Tasaka, K., Kanda, Y., Nishio, Y., Jikihara, H., Matsuura, N. and Murata, Y. (1999) Role of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase cascade in gonadotropin-releasing hormone-induced growth inhibition of a human ovarian cancer cell line. *Cancer Res*, 59, 5133-5142.

[0522] Kraus, S., Benard, O., Naor, Z. and Seger, R. (2003) c-Src is activated by the epidermal growth factor receptor in a pathway that mediates JNK and ERK activation by gonadotropin-releasing hormone in COS7 cells. *J Biol Chem*, 278, 32618-32630.

[0523] Kraus, S., Levy, G., Hanoch, T., Naor, Z. and Seger, R. (2004) Gonadotropin-releasing hormone induces apoptosis of prostate cancer cells: role of c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase, protein kinase B, and extracellular signal-regulated kinase pathways. *Cancer Res*, 64, 5736-5744.

[0524] Limonta, P. , Moretti, R. M. , Marelli, M. M. and Motta, M. (2003) The biology of gonadotropin hormone-releasing hormone: role in the control of tumor growth and progression in humans. *Front Neuroendocrinol*, 24, 279-295.

[0525] Luttrell, L. M. (2003) ' Location, location, location ' : activation and targeting of MAPkinases by G protein-coupled receptors. *J Mol Endocrinol*, 30, 117-126.

[0526] Maudsley, S. , Davidson, L. , Pawson, A. J. , Chan, R. , López de Maturana, R. and Millar, R. P. (2004) Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) antagonists promote proapoptotic signaling in peripheral reproductive tumor cells by activating a G $\alpha$  coupling state of the type I GnRH receptor. *Cancer Res*, 64, 7533-7544.







- [0111] <223> 以 NH<sub>2</sub> 取代 COOH 末端基团
- [0112] <400>5
- [0113] Xaa His Trp Ser His Arg Trp Tyr Pro
- [0114] 1 5
- [0115] <210>6
- [0116] <211>10
- [0117] <212>PRT
- [0118] <213> 人工序列
- [0119] <220>
- [0120] <223> 肽 x1
- [0121] <220>
- [0122] <221> 各种特征
- [0123] <222>(1)... (1)
- [0124] <223> 焦谷氨酸盐
- [0125] <220>
- [0126] <221> 各种特征
- [0127] <222>(6)... (6)
- [0128] <223>D- 异构体形式
- [0129] <220>
- [0130] <221> 各种特征
- [0131] <222>(10)... (10)
- [0132] <223> 以 NH<sub>2</sub> 取代 COOH 末端基团
- [0133] <400>6
- [0134] Xaa His Trp Ser His Arg Trp Tyr Pro Gly
- [0135] 1 5 10
- [0136] <210>7
- [0137] <211>10
- [0138] <212>PRT
- [0139] <213> 人工序列
- [0140] <220>
- [0141] <223> 肽 y1
- [0142] <220>
- [0143] <221> 各种特征
- [0144] <222>(1)... (1)
- [0145] <223> 焦谷氨酸盐
- [0146] <220>
- [0147] <221> 各种特征
- [0148] <222>(6)... (6)
- [0149] <223>D- 异构体形式





Z 或  $\beta$  Ala. Z 或 Pro 或 Pro. Z 或 DAla-Gly. Z 或 Gly. Z,, 其中 Z 是除去了 C 末端氨基酸残基上电荷的基团, 例如 NH<sub>2</sub> 或 NHEt

- [0225] <400>10  
 [0226] Xaa His Trp Ser Xaa Gly Xaa Xaa pro Xaa  
 [0227] 1 5 10  
 [0228] <210>11  
 [0229] <211>10  
 [0230] <212>PRT  
 [0231] <213> 人工序列  
 [0232] <220>  
 [0233] <223> 肽 a1  
 [0234] <220>  
 [0235] <221> 各种特征  
 [0236] <222>(1)... (1)  
 [0237] <223> 焦谷氨酸盐  
 [0238] <220>  
 [0239] <221> 各种特征  
 [0240] <222>(10)... (10)  
 [0241] <223> 以 NH<sub>2</sub> 取代 COOH 末端基团  
 [0242] <400>11  
 [0243] Xaa His Trp Ser His Gly Leu Arg Pro Gly  
 [0244] 1 5 10  
 [0245] <210>12  
 [0246] <211>10  
 [0247] <212>PRT  
 [0248] <213> 人工序列  
 [0249] <220>  
 [0250] <223> 肽 b1  
 [0251] <220>  
 [0252] <221> 各种特征  
 [0253] <222>(1)... (1)  
 [0254] <223> 焦谷氨酸盐  
 [0255] <220>  
 [0256] <221> 各种特征  
 [0257] <222>(10)... (10)  
 [0258] <223> 以 NH<sub>2</sub> 取代 COOH 末端基团  
 [0259] <400>12  
 [0260] Xaa His Trp Ser Tyr Gly Trp Arg Pro Gly  
 [0261] 1 5 10





- [0340] <220>
- [0341] <221> 各种特征
- [0342] <222>(6)... (6)
- [0343] <223> 任何 D- 氨基酸
- [0344] <220>
- [0345] <221> 各种特征
- [0346] <222>(10)... (10)
- [0347] <223>Z 或 azaGly 或 azaGly. Z 或 DAla. Z 或 Glu. Z 或 DAla-Glu. Z 或 DAla-DAla. Z 或  $\beta$  Ala. Z 或 Pro 或 Pro. Z 或 DAla-Gly. Z 或 Gly. Z, 其中 Z 是除去了 C 末端氨基酸残基上电荷的基团, 例如 NH<sub>2</sub> 或 NHEt
- [0348] <400>17
- [0349] Xaa His Trp Ser His Xaa Trp Tyr Pro Xaa
- [0350] 1 5 10
- [0351] <210>18
- [0352] <211>10
- [0353] <212>PRT
- [0354] <213> 人工序列
- [0355] <220>
- [0356] <223> 肽 i
- [0357] <220>
- [0358] <221> 各种特征
- [0359] <222>(1)... (1)
- [0360] <223> 焦谷氨酸盐
- [0361] <220>
- [0362] <221> 各种特征
- [0363] <222>(6)... (6)
- [0364] <223>D- 异构体形式
- [0365] <220>
- [0366] <221> 各种特征
- [0367] <222>(10)... (10)
- [0368] <223>Z 或 azaGly 或 azaGly. Z 或 DAla. Z 或 Glu. Z 或 DAla-Glu. Z 或 DAla-DAla. Z 或  $\beta$  Ala. Z 或 Pro 或 Pro. Z 或 DAla-Gly. Z 或 Gly. Z, 其中 Z 是除去了 C 末端氨基酸残基上电荷的基团, 例如 NH<sub>2</sub> 或 NHEt
- [0369] <400>18
- [0370] Xaa His Trp Ser His Arg Trp Tyr Pro Xaa
- [0371] 1 5 10
- [0372] <210>19
- [0373] <211>10
- [0374] <212>PRT



电荷的基团,例如 NH<sub>2</sub> 或 NHEt

[0411] <400>20

[0412] Xaa His Trp Ser Tyr Lys Trp Gln Pro Xaa

[0413] 1 5 10

[0414] <210>21

[0415] <211>10

[0416] <212>PRT

[0417] <213> 人工序列

[0418] <220>

[0419] <223> 肽 iv

[0420] <220>

[0421] <221> 各种特征

[0422] <222>(1)... (1)

[0423] <223> 焦谷氨酸盐

[0424] <220>

[0425] <221> 各种特征

[0426] <222>(6)... (6)

[0427] <223>D- 异构体形式

[0428] <220>

[0429] <221> 各种特征

[0430] <222>(10)... (10)

[0431] <223>Z 或 azaGly 或 azaGly. Z 或 DA1a. Z 或 Glu. Z 或 DA1a-Glu. Z 或 DA1a-DA1a. Z 或  $\beta$ Ala. Z 或 Pro 或 Pro. Z 或 DA1a-Gly. Z 或 Gly. Z, 其中 Z 是除去了 C 末端氨基酸残基上电荷的基团,例如 NH<sub>2</sub> 或 NHEt

[0432] <400>21

[0433] Xaa His Trp Ser Tyr Lys Trp Leu Pro Xaa

[0434] 1 5 10

[0435] <210>22

[0436] <211>10

[0437] <212>PRT

[0438] <213> 人工序列

[0439] <220>

[0440] <223> 肽 v

[0441] <220>

[0442] <221> 各种特征

[0443] <222>(1)... (1)

[0444] <223> 焦谷氨酸盐

[0445] <220>

[0446] <221> 各种特征

- [0447] <222>(6)... (6)
- [0448] <223>D- 异构体形式
- [0449] <220>
- [0450] <221> 各种特征
- [0451] <222>(10)... (10)
- [0452] <223>Z 或 azaGly 或 azaGly. Z 或 DAla. Z 或 Glu. Z 或 DAla-Glu. Z 或 DAla-DAla. Z 或  $\beta$  Ala. Z 或 Pro 或 Pro. Z 或 DAla-Gly. Z 或 Gly. Z, 其中 Z 是除去了 C 末端氨基酸残基上电荷的基团, 例如 NH<sub>2</sub> 或 NHEt
- [0453] <400>22
- [0454] Xaa His Trp Ser Tyr Lys Trp Tyr Pro Xaa
- [0455] 1 5 10
- [0456] <210>23
- [0457] <211>10
- [0458] <212>PRT
- [0459] <213> 人工序列
- [0460] <220>
- [0461] <223> 肽 vB
- [0462] <220>
- [0463] <221> 各种特征
- [0464] <222>(1)... (1)
- [0465] <223> 焦谷氨酸盐
- [0466] <220>
- [0467] <221> 各种特征
- [0468] <222>(6)... (6)
- [0469] <223>D- 异构体形式
- [0470] <220>
- [0471] <221> 各种特征
- [0472] <222>(10)... (10)
- [0473] <223>Z 或 azaGly 或 azaGly. Z 或 DAla. Z 或 Glu. Z 或 DAla-Glu. Z 或 DAla-DAla. Z 或  $\beta$  Ala. Z 或 Pro 或 Pro. Z 或 DAla-Gly. Z 或 Gly. Z, 其中 Z 是除去了 C 末端氨基酸残基上电荷的基团, 例如 NH<sub>2</sub> 或 NHEt
- [0474] <400>23
- [0475] Xaa His Trp Ser Tyr Lys Trp Arg Pro Xaa
- [0476] 1 5 10
- [0477] <210>24
- [0478] <211>10
- [0479] <212>PRT
- [0480] <213> 人工序列
- [0481] <220>



- [0517] Xaa His Trp Ser His Lys Trp Tyr Pro Xaa  
 [0518] 1 5 10  
 [0519] <210>26  
 [0520] <211>10  
 [0521] <212>PRT  
 [0522] <213> 人工序列  
 [0523] <220>  
 [0524] <223> 肽 viii  
 [0525] <220>  
 [0526] <221> 各种特征  
 [0527] <222>(1)... (1)  
 [0528] <223> 焦谷氨酸盐  
 [0529] <220>  
 [0530] <221> 各种特征  
 [0531] <222>(6)... (6)  
 [0532] <223>D- 异构体形式  
 [0533] <220>  
 [0534] <221> 各种特征  
 [0535] <222>(10)... (10)  
 [0536] <223>NH<sub>2</sub> 或 NH<sub>2</sub> 或 DA1a. NH<sub>2</sub> 或 Z,, 其中 Z 是除去了 C 末端氨基酸残基上电荷的基团, 例如 NH<sub>2</sub> 或 NHEt  
 [0537] <400>26  
 [0538] Xaa His Trp Ser His Arg Trp Tyr Pro Xaa  
 [0539] 1 5 10  
 [0540] <210>27  
 [0541] <211>10  
 [0542] <212>PRT  
 [0543] <213> 人工序列  
 [0544] <220>  
 [0545] <223> 肽 ix  
 [0546] <220>  
 [0547] <221> 各种特征  
 [0548] <222>(1)... (1)  
 [0549] <223> 焦谷氨酸盐  
 [0550] <220>  
 [0551] <221> 各种特征  
 [0552] <222>(6)... (6)  
 [0553] <223>D- 异构体形式  
 [0554] <220>













- [0777] <220>  
 [0778] <221> 各种特征  
 [0779] <222>(1)... (1)  
 [0780] <223> 焦谷氨酸盐  
 [0781] <220>  
 [0782] <221> 各种特征  
 [0783] <222>(6)... (6)  
 [0784] <223>D- 异构体形式  
 [0785] <220>  
 [0786] <221> 各种特征  
 [0787] <222>(10)... (10)  
 [0788] <223> 以 NH<sub>2</sub> 取代 COOH 末端基团  
 [0789] <400>38  
 [0790] Xaa His Trp Ser Tyr Lys Trp Arg Pro Gly  
 [0791] 1 5 10  
 [0792] <210>39  
 [0793] <211>10  
 [0794] <212>PRT  
 [0795] <213> 人工序列  
 [0796] <220>  
 [0797] <223> 肽 vi-1  
 [0798] <220>  
 [0799] <221> 各种特征  
 [0800] <222>(1)... (1)  
 [0801] <223> 焦谷氨酸盐  
 [0802] <220>  
 [0803] <221> 各种特征  
 [0804] <222>(6)... (6)  
 [0805] <223>D- 异构体形式  
 [0806] <220>  
 [0807] <221> 各种特征  
 [0808] <222>(10)... (10)  
 [0809] <223> 以 NH<sub>2</sub> 取代 COOH 末端基团  
 [0810] <400>39  
 [0811] Xaa His Trp Ser Tyr Trp Trp Arg Pro Gly  
 [0812] 1 5 10  
 [0813] <210>40  
 [0814] <211>10  
 [0815] <212>PRT





- [0894] <400>43  
 [0895] Xaa His Trp Ser His Trp Trp Arg Pro Gly  
 [0896] 1 5 10  
 [0897] <210>44  
 [0898] <211>10  
 [0899] <212>PRT  
 [0900] <213> 肽 xi-1  
 [0901] <220>  
 [0902] <221> 各种特征  
 [0903] <222>(1)... (1)  
 [0904] <223> 焦谷氨酸盐  
 [0905] <220>  
 [0906] <221> 各种特征  
 [0907] <222>(6)... (6)  
 [0908] <223>D- 异构体形式  
 [0909] <220>  
 [0910] <221> 各种特征  
 [0911] <222>(10)... (10)  
 [0912] <223> 以 NH<sub>2</sub> 取代 COOH 末端基团  
 [0913] <400>44  
 [0914] Xaa His Trp Ser His Trp Leu Arg Pro Gly  
 [0915] 1 5 10  
 [0916] <210>45  
 [0917] <211>10  
 [0918] <212>PRT  
 [0919] <213> 人工序列  
 [0920] <220>  
 [0921] <223> 肽 xii-1  
 [0922] <220>  
 [0923] <221> 各种特征  
 [0924] <222>(1)... (1)  
 [0925] <223> 焦谷氨酸盐  
 [0926] <220>  
 [0927] <221> 各种特征  
 [0928] <222>(6)... (6)  
 [0929] <223>D- 异构体形式  
 [0930] <220>  
 [0931] <221> 各种特征  
 [0932] <222>(10)... (10)





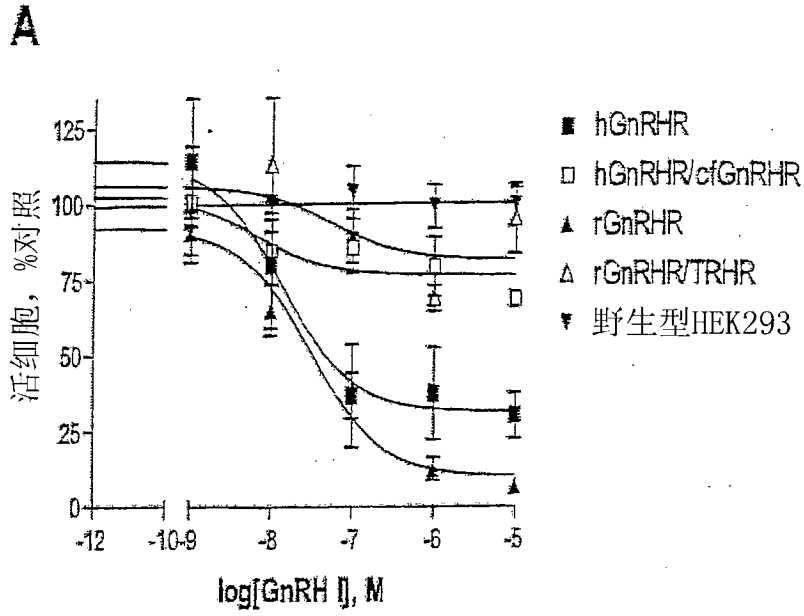


图 1A

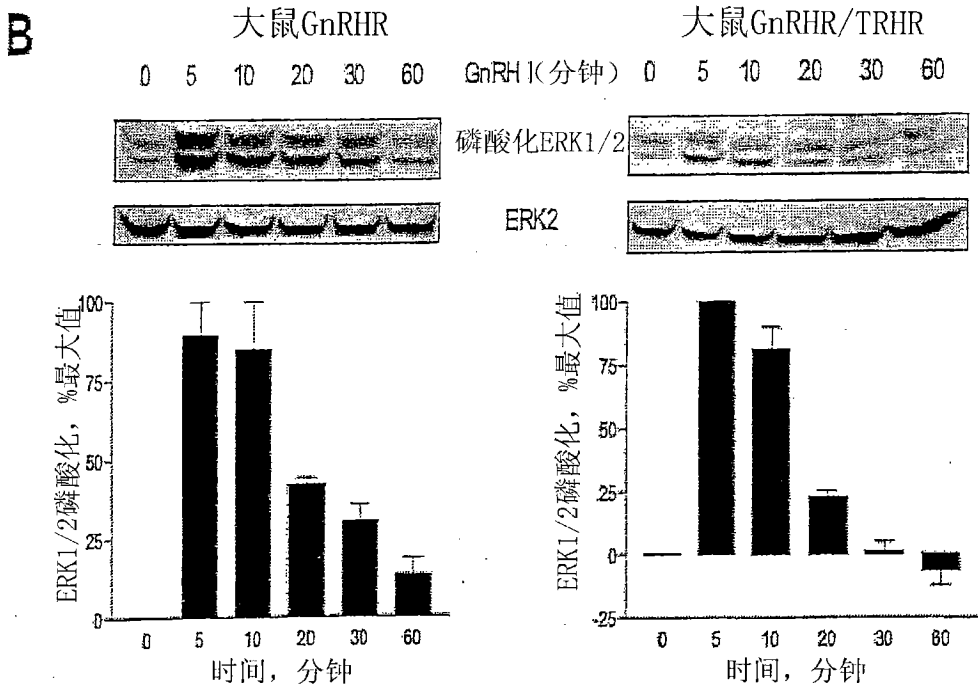


图 1B

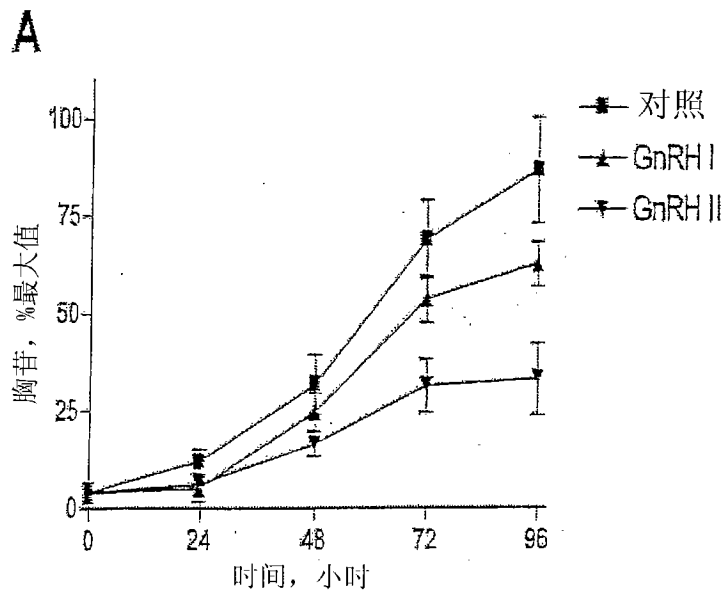


图 2A

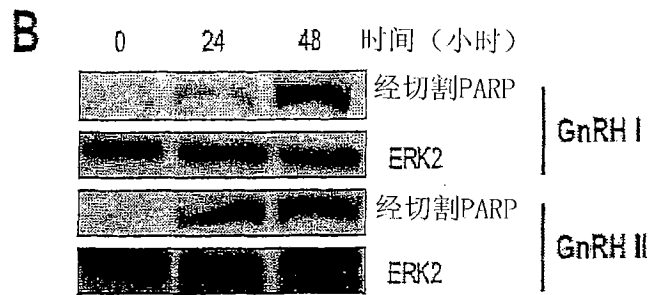


图 2B

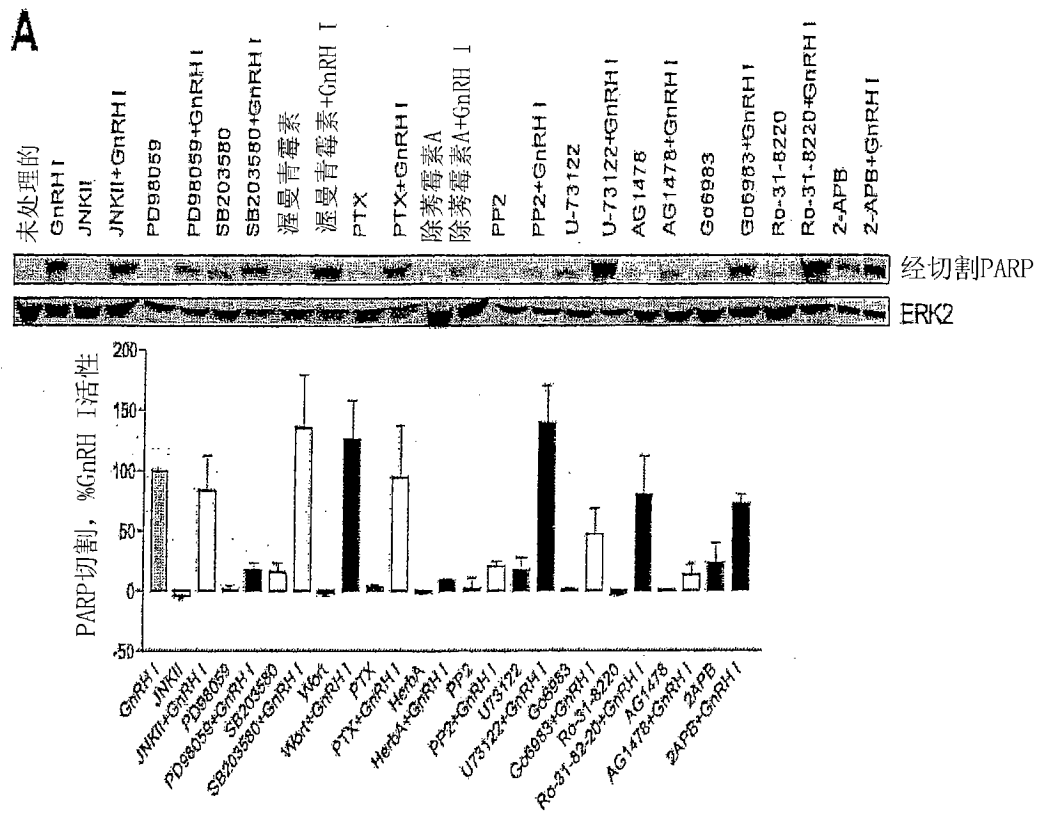


图 3A

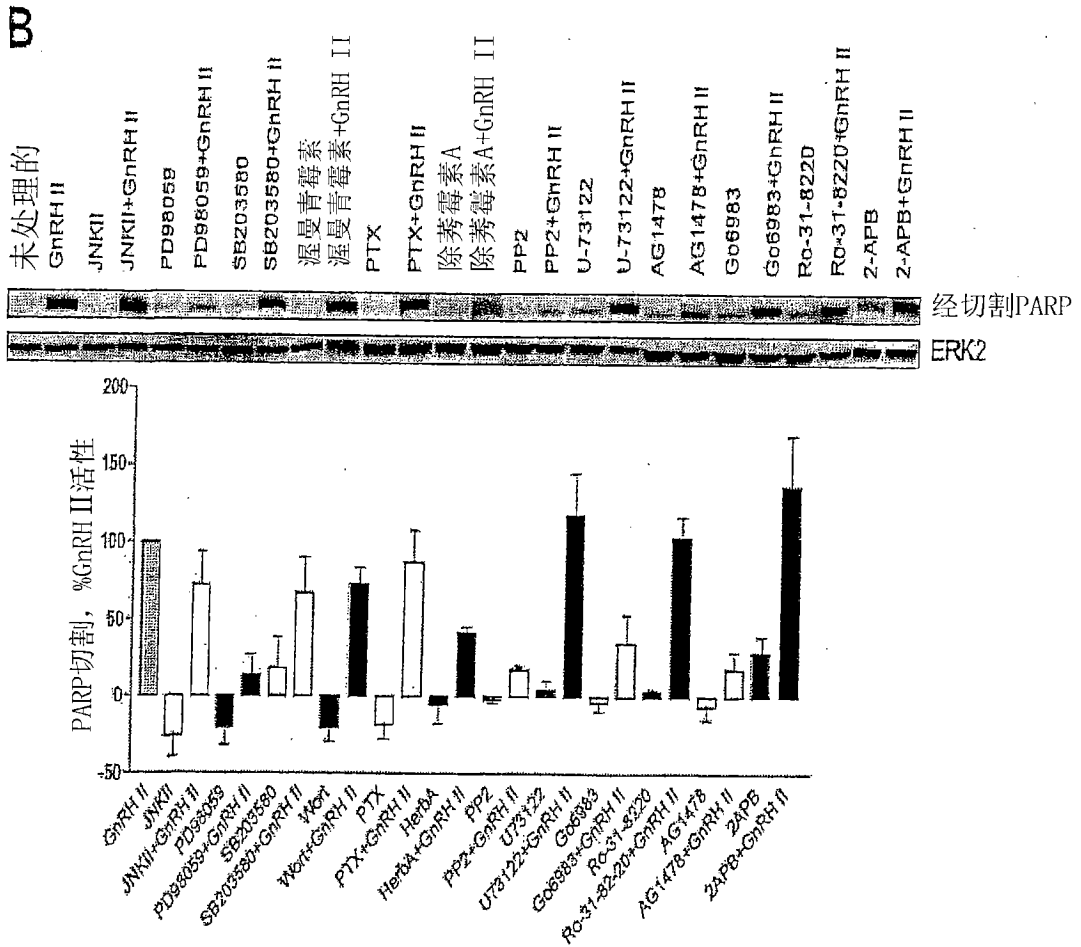


图 3B

**A**

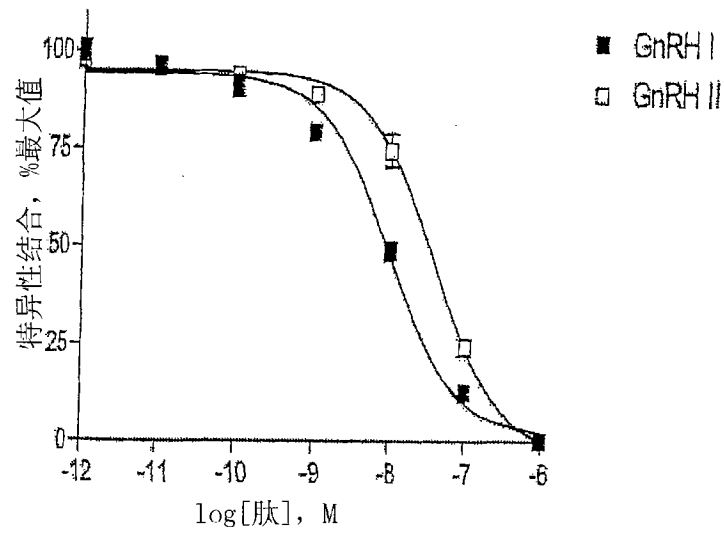


图 4A

**B**

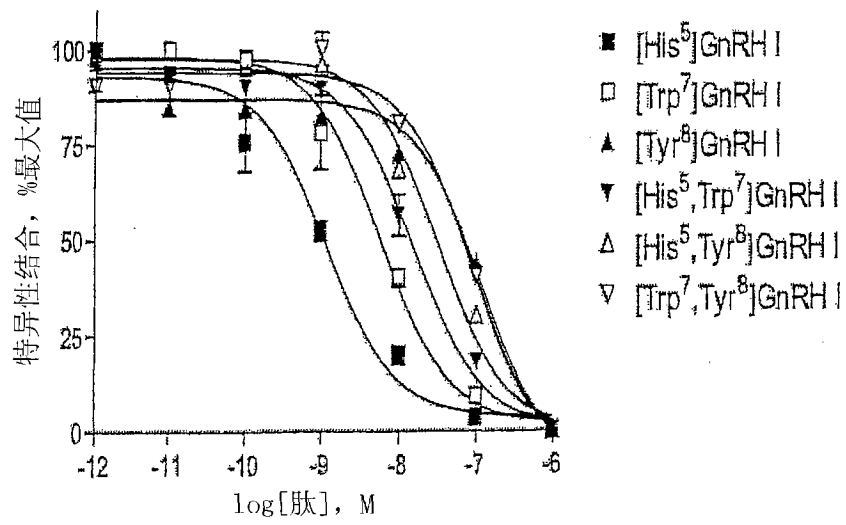


图 4B

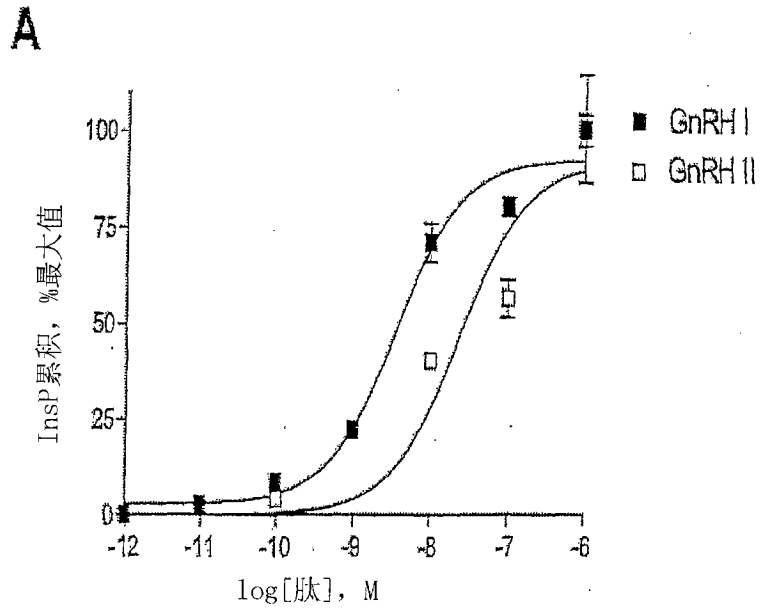


图 5A

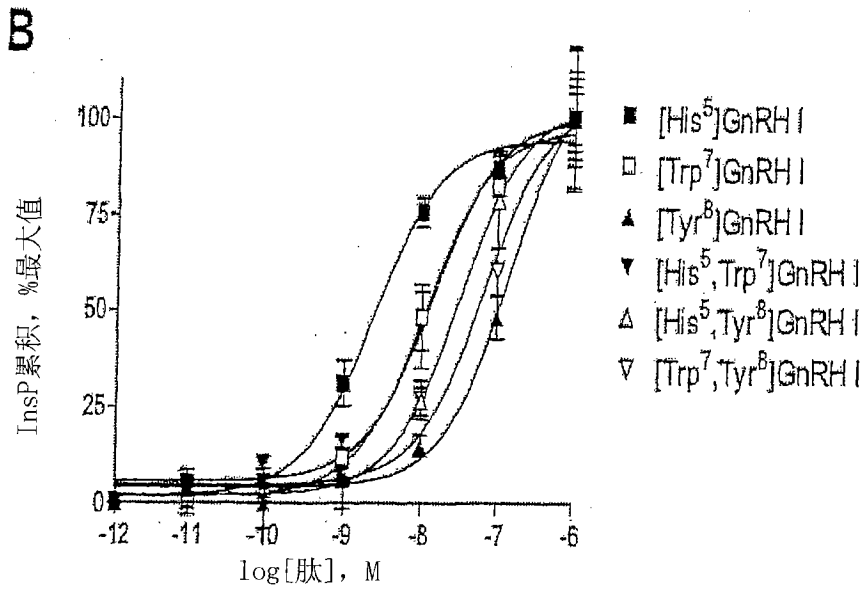


图 5B

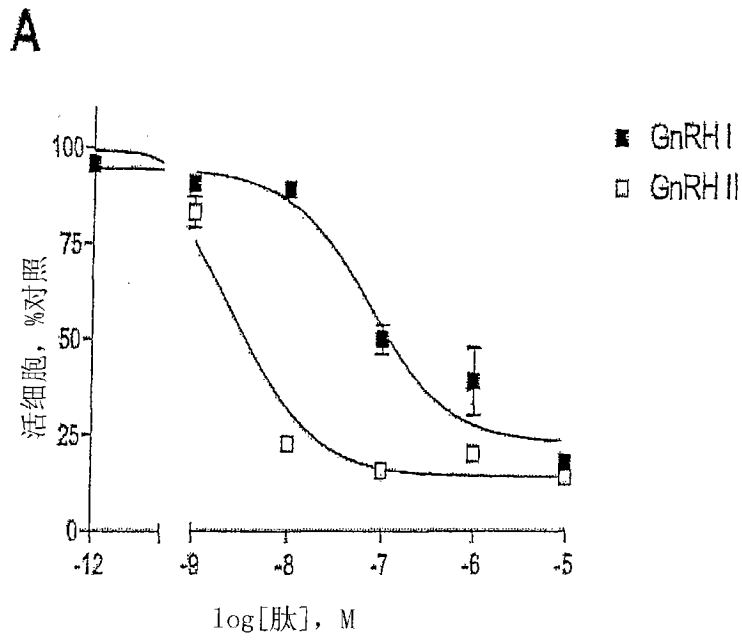


图 6A

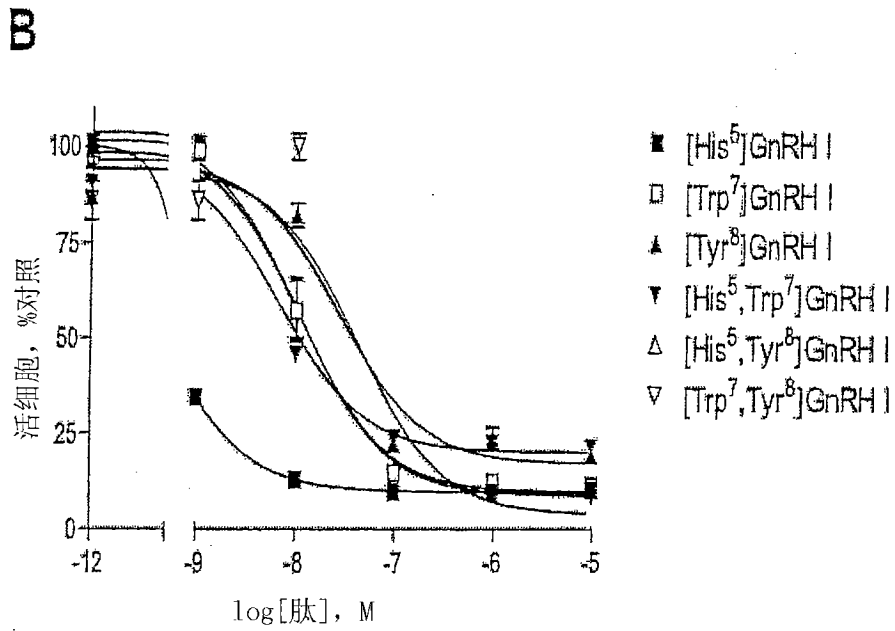


图 6B

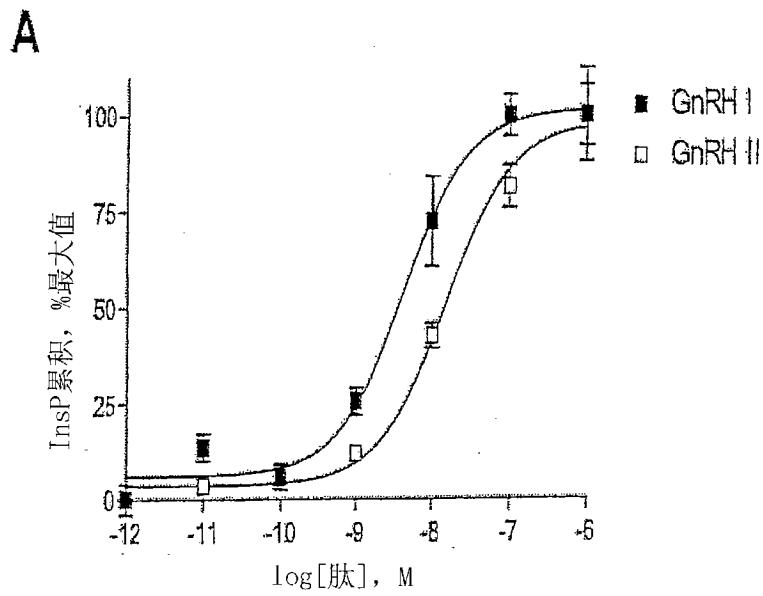


图 7A

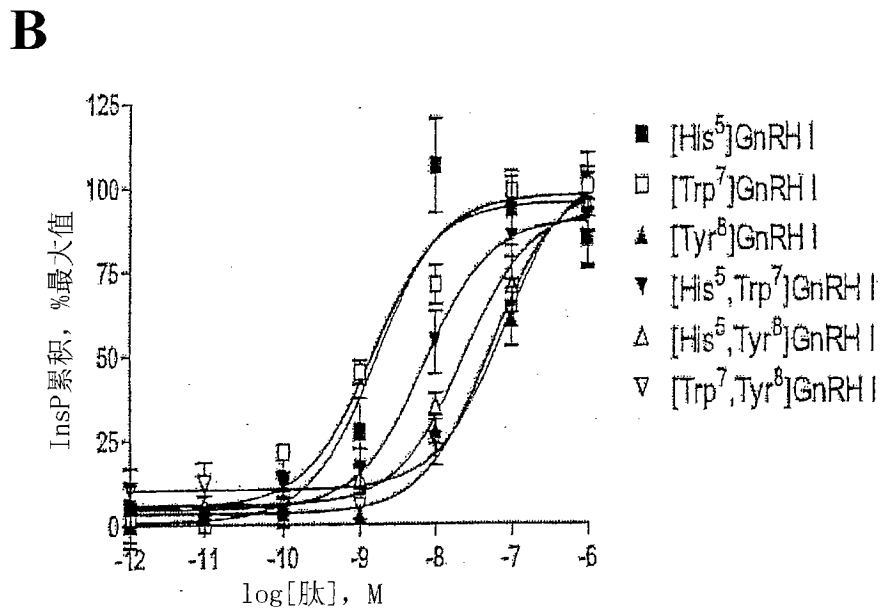


图 7B

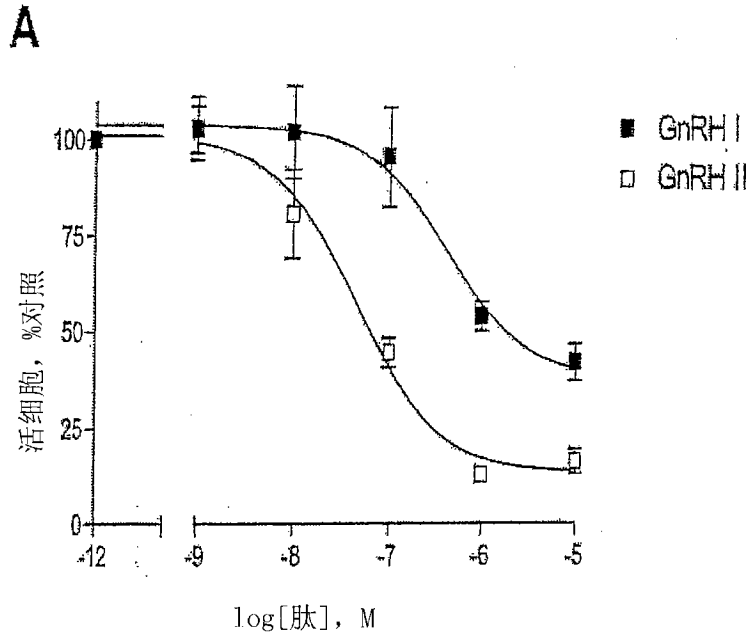


图 8A

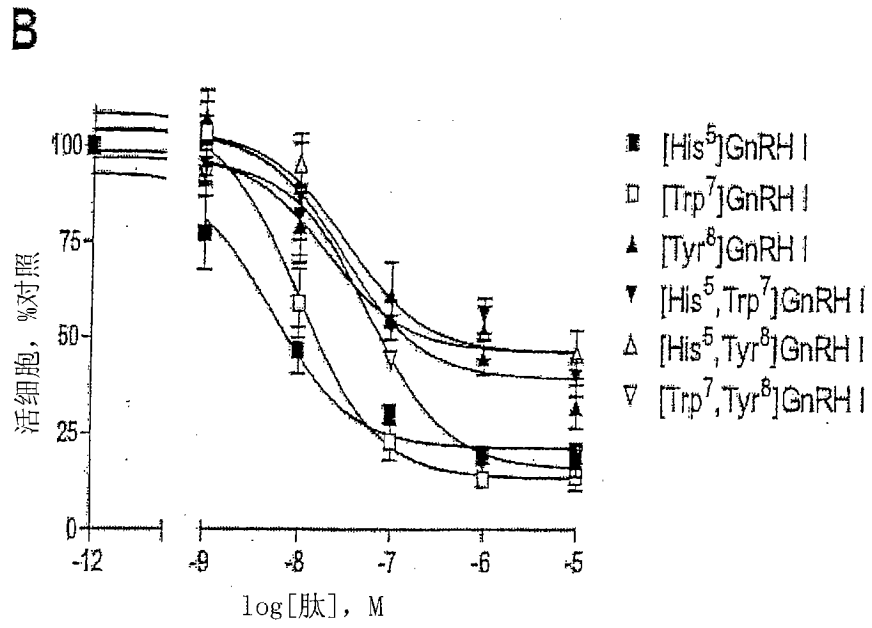


图 8B

	IC <sub>50</sub>	EC <sub>50</sub> (IP)	EC <sub>50</sub> (PA)
GnRH I	6.68 ± 2.63	7.01 ± 1.66	94.97 ± 14.62
GnRH II	44.43 ± 12.43 *	33.00 ± 11.07 *	7.31 ± 5.55 **
[His <sup>5</sup> ]GnRH I	1.81 ± 1.17	1.92 ± 0.28	0.28 ± 0.08 ***
[Trp <sup>7</sup> ]GnRH I	5.08 ± 0.53	8.38 ± 2.77	10.45 ± 3.99 **
[Tyr <sup>8</sup> ]GnRH I	182.2 ± 79.06	226.00 ± 81.02 ***	22.46 ± 3.87 **
[His <sup>5</sup> ,Trp <sup>7</sup> ]GnRH I	12.14 ± 1.45	10.52 ± 2.92	8.37 ± 4.36 **
[His <sup>5</sup> ,Tyr <sup>8</sup> ]GnRH I	29.74 ± 8.70	51.95 ± 13.67 ***	15.01 ± 2.90 **
[Trp <sup>7</sup> ,Tyr <sup>8</sup> ]GnRH I	113.7 ± 21.23 **	100.80 ± 42.66 *	36.43 ± 7.24 *

表1

	EC <sub>50</sub> (IP)	EC <sub>50</sub> (PA)
GnRH I	3.24 ± 0.94	327.00 ± 90.78 *
GnRH II	20.07 ± 7.14 *	49.09 ± 12.06 *
[His <sup>5</sup> ]GnRH I	1.13 ± 0.55	6.22 ± 2.14 *
[Trp <sup>7</sup> ]GnRH I	1.74 ± 0.62	16.91 ± 8.59 *
[Tyr <sup>8</sup> ]GnRH I	76.80 ± 34.54 **	30.57 ± 2.91 *
[His <sup>5</sup> ,Trp <sup>7</sup> ]GnRH I	8.11 ± 1.75 *	16.55 ± 1.61 *
[His <sup>5</sup> ,Tyr <sup>8</sup> ]GnRH I	30.06 ± 7.57 ***	31.40 ± 2.81 *
[Trp <sup>7</sup> ,Tyr <sup>8</sup> ]GnRH I	103.8 ± 49.73 *	33.78 ± 12.96 *

表2

18.11.05

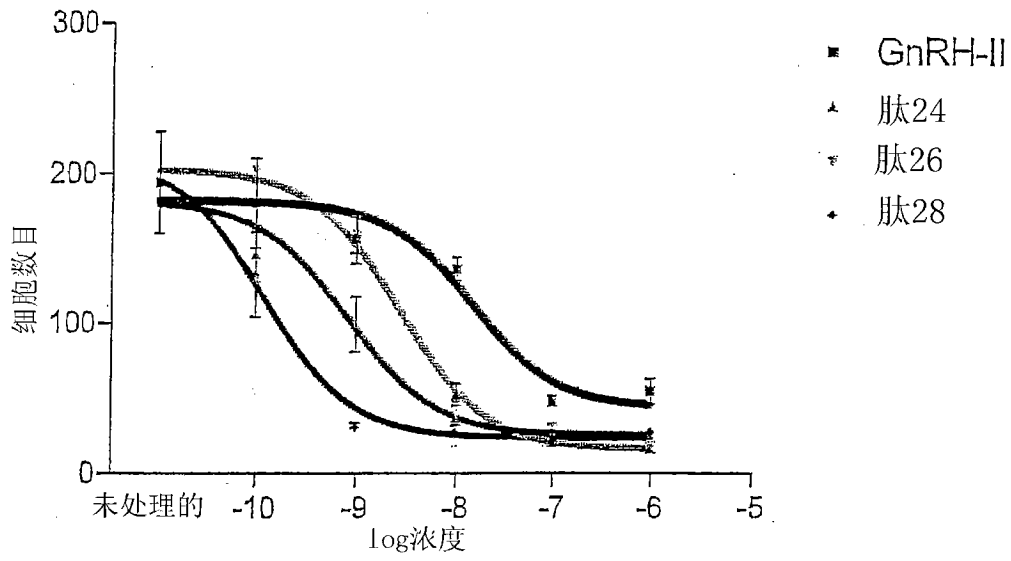


图 9

24.02.06

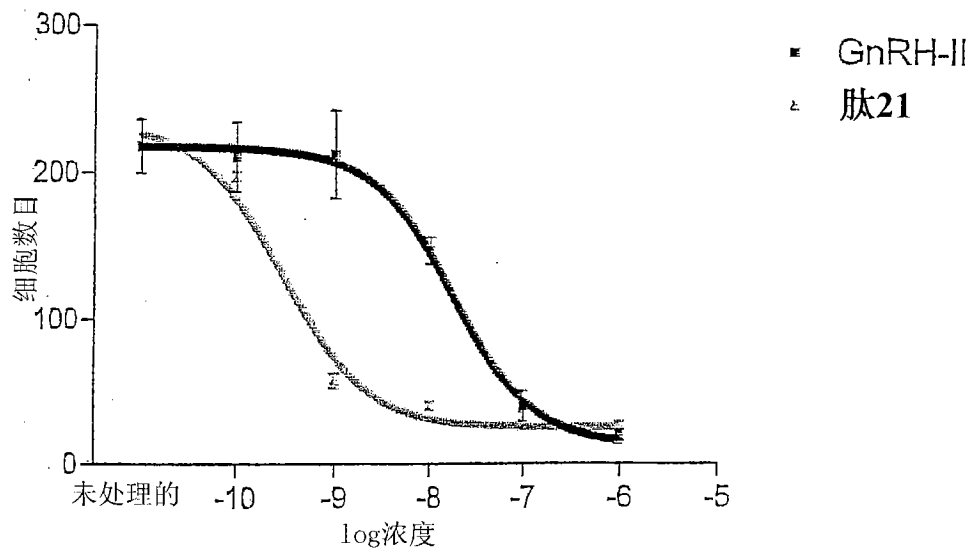


图 10

30.09.05

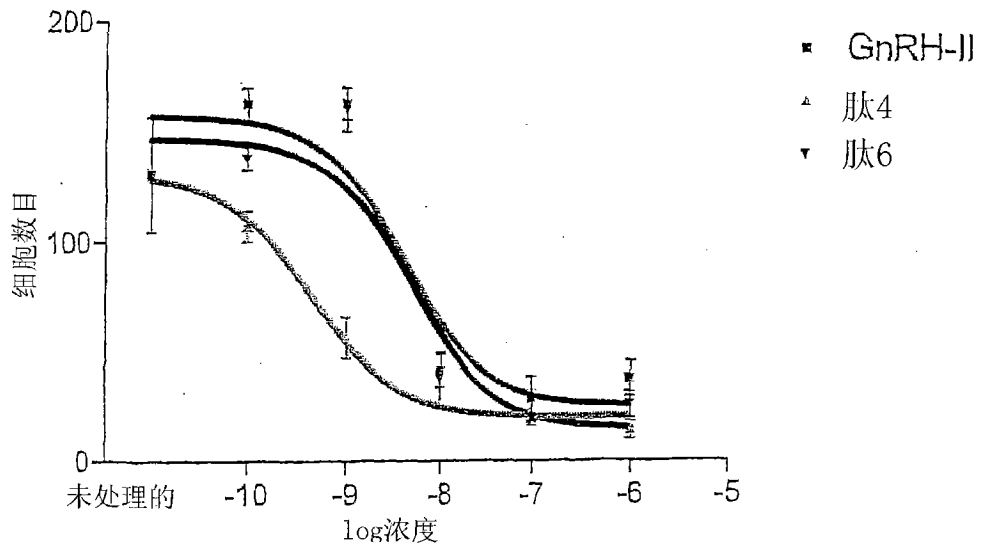


图 11

10.03.06

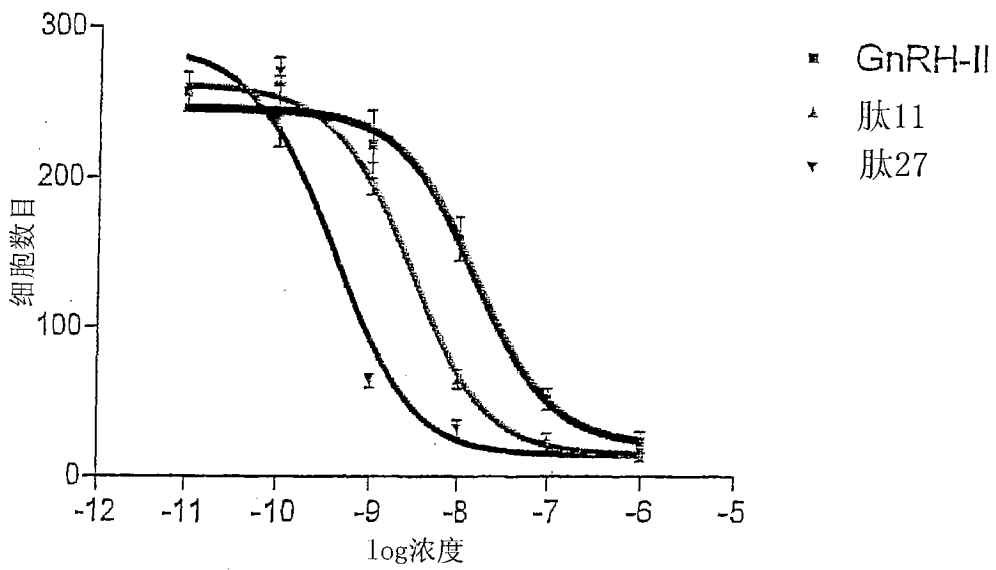


图 12

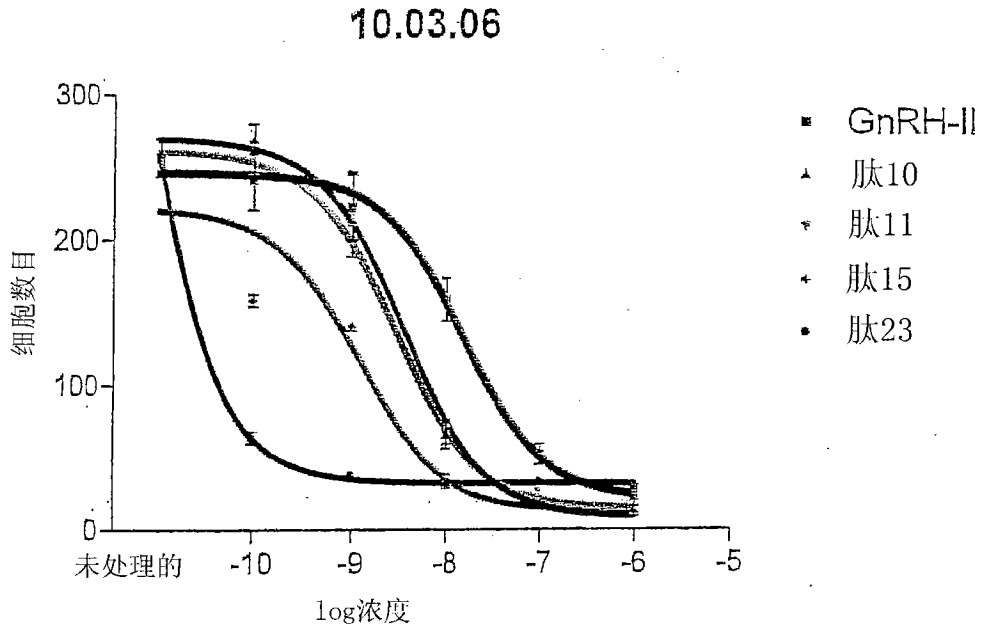


图 13

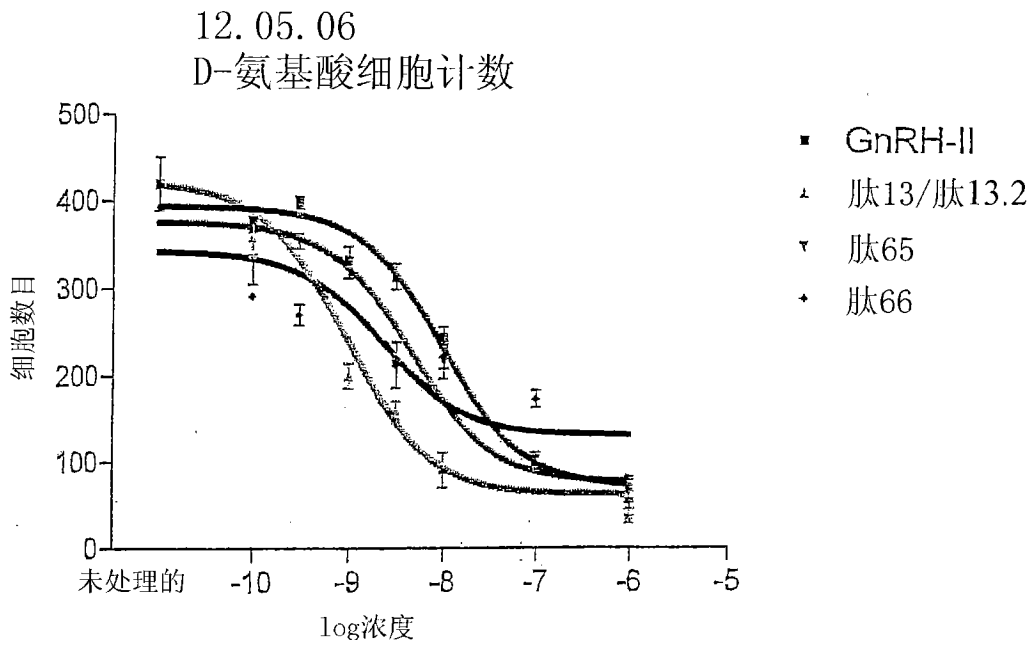


图 14

GnRH类似物相对于GnRH-II的抑制表达人类GnRH受体的HEK 293细胞中细胞数目和抑制磷酸肌醇产生的活性

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	活性 (相对于GnRH-II的倍数)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	对细胞数目的平均抑制 ± SEM	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	对磷酸肌醇产生的平均抑制	
GnRH-II		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
肽4	Pro											8.29+/-1.01	3.33
肽6												1.18+/-0.36	1.20
肽10												3.72+/-0.38	0.84
肽11												7.92+/-1.28	1.97
肽13												10.51+/-2.77	3.70
肽15												29.8+/- 7.9	3.70
肽21												51.15+/-12.1	ND
肽23												2333.3+/-591.4	ND
肽24												13.63+/-4.0	0.37
肽26												4.8+/-1.37	0.15
肽27												38.5+/-6.7	11.93
肽28												131+/-17.2	11.45
肽65												2.03+/-0.417	3.82
肽66												1.1+/-1.04	0.52
肽13.2												10.51+/-2.77	3.70

表3

ND: 未做